

Biochemische und strukturelle Analyse des P-Proteins aus
Synechocystis sp. PCC 6803

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt
von Dirk Hasse
aus Rostock

Mai 2010

Gutachter

Prof Dr. Hermann Bauwe

Universität Rostock, Biowissenschaften, Pflanzenphysiologie

Prof. Dr. Inger Andersson

Department of Molecular Biology, SLU, Uppsala

Datum des öffentlichen Kolloquiums: 08.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	iii
2.	Einleitung	1
2.1.	Das „glycine cleavage system“	1
2.1.1.	Aufbau des „glycine cleavage system“	2
2.1.2.	Allgemeine GCS-Funktion	4
2.2.	GCS-Funktion in der pflanzlichen Photorespiration	5
2.2.1.	Die Oxygenase-Aktivität der RubisCO	6
2.2.2.	Der photorespiratorische C ₂ -Zyklus	7
2.2.3.	GCS in Pflanzenmitochondrien	8
3.	Zielstellung der Arbeit	11
4.	Material und Methoden	13
4.1.	Materialien	13
4.1.1.	Verwendete DNA-und Proteingrößenstandards	13
4.1.2.	Oligonukleotide	13
4.1.3.	Synthetisierte Plasmide	14
4.1.4.	Bakterienkulturen und Kultivierungsmedien	14
4.1.5.	Medienzusätze	15
4.2.	Methoden	15
4.2.1.	Mikrobiologische Methoden	15
4.2.2.	Molekularbiologische Methoden	16
4.2.3.	Agarose-Gelelektrophorese	17
4.2.4.	DNA-Klonierung	18
4.2.5.	Isolierung von Mitochondrien aus <i>P. sativum</i>	18
4.2.6.	Proteinbiochemische Methoden	19
4.2.7.	Massenspektrometrische Untersuchungen	27
4.2.8.	Enzymatische Ansätze	28
5.	Ergebnisse	35
5.1.	Reinigung und Modifikation heterolog exprimierter Proteine	35
5.1.1.	Reinigung pro- und eukaryotischer GCS-Proteine für enzymatische Messungen	35
5.1.2.	Expression und Reinigung von Proteinen zur Kristallisation	45
5.2.	Enzymatische Messungen	56
5.2.1.	Aktivität des <i>Synechocystis</i> P-Proteins mit dem <i>Synechocystis</i> H-Protein	56
5.2.2.	Nutzung des <i>Synechocystis</i> P-Proteins zur Untersuchung der Substrateigenschaften von artfremden pro- und eukaryotischen H-Proteinen	59

5.3.	Kristallisation von GCS-Proteinen	66
5.3.1.	Kristallisation des P-Proteins aus <i>Synechocystis</i>	67
5.3.2.	Kristallisation des L-Proteins aus <i>Synechocystis</i>	75
6.	Diskussion	78
6.1.	Die Biochemie des P-Proteins	78
6.2.	Kooperation von H-Proteinen mit dem P-Protein aus <i>Synechocystis</i>	82
6.3.	Modifikation der GCS-Aktivität durch alternatives Spleißen des H-Proteins in <i>F. trinervia</i>	89
6.4.	Die Struktur des P-Proteins aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	93
7.	Zusammenfassung	99
8.	Literaturverzeichnis	101
9.	Anhang	111
9.1.	Hasse <i>et al.</i> , 2007	111
9.2.	Hasse <i>et al.</i> , 2009	112
9.3.	Hasse <i>et al.</i> , 2010	113
9.4.	Klonierte Plasmide	114
9.4.1.	Expressionsplasmide mit Basis pBAD-HisA	114
9.4.2.	Expressionsplasmide mit Basis pET-28a	115
9.4.3.	Expressionsplasmide mit Basis pET-28a	117
9.4.4.	Expressionsplasmid mit Basis pCA24N	118
9.5.	Liste der am ESRF aufgenommenen Datensätze	118
9.6.	Erklärung zur Selbstständigkeit	120
9.7.	Danksagung	121
9.8.	Publikationsliste	122
9.9.	Lebenslauf	123

1. Abkürzungsverzeichnis

<i>acc. nr.</i>	<i>accession number</i>
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosin-Diphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BCKDC	<i>branched chain-α-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
BV	Bettvolumen
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
DAAD	Deutscher Akademischer Austausch Dienst
DTT	Dithiothreitol
FAD ⁺	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GCS	<i>glycine cleavage system</i>
GGAT	Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase
HT	Hochdurchsatz (<i>high throughput</i>)
HTH	Helix-Turn-Helix-Motiv
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
kD	Kilodalton
KDC	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
LPL-A	Lipoatligase-A
LSU	<i>large subunit</i>
MIB-Puffer	Malonat, Imidazol und Borat (2:3:3)
mS	Millisiemens
CH ₂ -THF	Methylentetrahydrofolat
MW	<i>molecular weight</i> (Molmasse)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NKH	nichtketotische Hyperglycinämie
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PEG	Polyethylenglykol
PLP	Pyridoxalphosphat
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

RuBP	Ribulose-1,5-Bisphosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGAT	Serin-Glyoxylat-Aminotransferase
SHMT	Serinhydroxy-Methyltransferase
SSU	<i>small subunit</i>
SV	Säulenvolumen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofolat
Ve	Elutionsvolumen
V _o	Ausschlussvolumen
w/o	ohne (<i>without</i>)

2. Einleitung

Glycin ist mit nur zwei Kohlenstoffatomen die kleinste und einfachste α -Aminosäure, deren Name sich vom süßen Geschmack des reinen Glycins (gr. glykys: süß) ableitet. Es ist die einzige proteinogene Aminosäure, die nicht chiral und damit optisch aktiv ist. Es kann vom menschlichen Organismus selbst synthetisiert werden und ist für diesen nicht essenziell. Die Aminosäure nimmt im Stoffwechsel aller Organismen eine wichtige Position ein. Glycin ist Bestandteil von Purinen und Phospholipiden (Bauwe & Kolukisaoglu, 2003). Des Weiteren dient es der Synthese des Blutfarbstoffs Häm sowie von Kreatin und Glutathion. In der Leber wirkt es entgiftend und neutralisiert freie Radikale. Der Glycin-Anteil in Proteinen kann sehr hoch sein, so besteht z. B. Kollagen, ein wichtiger Bestandteil von Knochen, Zähnen, Sehnen, Bändern, Knorpel und der Haut, zu 35 % aus dieser sehr vielseitigen Aminosäure. Charakteristisch ist die Abfolge von den sich wiederholenden drei Aminosäuren Gly-X₁-X₂, wobei X₁ häufig Prolin und X₂ Hydroxyprolin ist (Beck *et al.*, 2000, Kishimoto *et al.*, 2005). Die geringe Größe des Glycins begünstigt hier die Ausbildung einer Tripelhelix-Struktur, die dem Gewebe eine enorme Zugfestigkeit verleiht. Im Rückenmark wirkt Glycin über den Glycinrezeptor als inhibitorischer Neurotransmitter. Dadurch ist es an der Regulation von Bewegungsabläufen beteiligt (Löffler & Petrides, 2003). Am *antifreeze* Protein des Schneeflohs *Hypogastrura haveyi* hat Glycin einen Anteil von 45 % (Graham & Davies, 2005).

Auch Pflanzen enthalten eine Reihe glycinreicher Proteine, z. B. die Strukturproteine der Zellwand (GRP). In den Blattmitochondrien der C₃-Pflanzen ist Glycin das bevorzugte Substrat (Oliver *et al.*, 1990). Es ist dort in Konzentrationen von ca. 6 mM vorhanden und wird bei Belichtung insbesondere im Prozess des photorespiratorischen C₂-Zyklus erzeugt.

2.1. Das „*glycine cleavage system*“

Der oxidative Abbau von Glycin findet über das *glycine cleavage system* (GCS; *glycine decarboxylase complex* oder *glycine dehydrogenase*) statt. GCS ist ein Multienzymkomplex, der ubiquitär verbreitet ist. Zusammen mit der SHMT katalysiert GCS die reversible Reaktion von Glycin zu Serin, CO₂, NH₃ sowie Methylentetrahydrofolat (CH₂-THF). Die Bildung von CH₂-THF stellt einen essenziellen Schritt bei der Synthese von C₁-Einheiten dar, welche für die Bildung von Serin, Purinen, Methionin, Thymin und anderen methylierten Verbindungen benötigt werden (Christensen & MacKenzie, 2006, Nzila *et al.*, 2005). Die GCS-Biochemie wurde in Organismen wie *Escherichia coli* (Okamura-Ikeda *et al.*, 1993), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hasse *et al.*, 2007), *Eubacterium acidaminophilum* (Freudenberg & Andreesen, 1989), *Peptococcus glycinophilus* (Klein & Sagers, 1966a), *Arthrobacter globiformis* (Kochi & Kikuchi, 1974) sowie *Pisum sativum* (Bourguignon *et al.*, 1988, Walker & Oliver, 1986), Huhn (Hiraga & Kikuchi, 1980) und Ratte (Hayasaka *et al.*, 1980) eingehend untersucht. GCS

besteht aus vier Komponenten. Diese werden gewöhnlich als P-, T-, L- und H-Protein bezeichnet (Douce *et al.*, 2001, Kikuchi, 1973), während diese in Bakterien gelegentlich als P₁ (P-Protein), P₂ (H-Protein), P₃ (L-Protein) und P₄ (T-Protein) benannt werden (Freudenberg & Andreessen, 1989, Gariboldi & Drake, 1984, Klein & Sagers, 1967, Robinson *et al.*, 1973, Tait, 1970).

2.1.1. Aufbau des „glycine cleavage system“

Das P-Protein ist ein Pyridoxalphosphat (PLP) bindendes Enzym und die eigentliche Glycin-decarboxylierende Untereinheit. In Eukaryoten und einigen Prokaryoten ist dieses Protein ein Homodimer (α_2) mit einer Molmasse von ca. 210 kD (Bauwe *et al.*, 1995, Hasse *et al.*, 2007, Kume *et al.*, 1991, Okamura-Ikeda *et al.*, 1993, Walker & Oliver, 1986). In grampositiven und vielen extremophilen Bakterien weist das P-Protein jedoch den Aufbau eines Heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$) mit einer Molmasse von ca. 230 kD auf (Freudenberg & Andreessen, 1989, Gariboldi & Drake, 1984, Nakai *et al.*, 2005). Die Größe der α -Untereinheit (entspricht dem N-Terminus im Homodimer) beträgt ca. 60 kD und die β -Untereinheit (entspricht dem C-Terminus im Homodimer) besitzt eine Größe von ca. 55 kD.

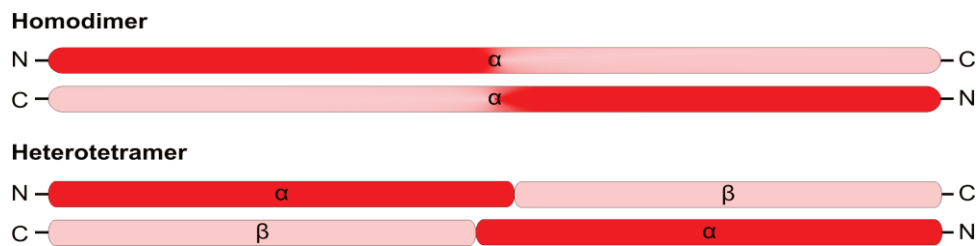


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von homodimeren und heterotetrameren P-Proteinen.

Die prosthetische Gruppe PLP bindet durch kovalente und nichtkovalente Wechselwirkungen an die β -Untereinheit der heterotetrameren P-Proteine und an den C-Terminus der homodimeren P-Proteine. Diese Domäne ist durch eine glycinreiche Sequenz und ein stark konserviertes Glycinmotiv gekennzeichnet (Fujiwara *et al.*, 1987).

Das P-Protein benötigt für die Decarboxylierungsreaktion ein Partnerprotein, das H- oder P₂-Protein. Dieses kleine (ca. 15 kD) und hitzestabile Protein, auch *hydrogen carrier protein* genannt, empfängt nach der Abspaltung der α -Carboxylgruppe des Glycins den verbleibenden Aminomethylen-Rest. Das H-Protein selbst hat keine katalytische Aktivität. Die funktionelle Gruppe des Proteins ist eine C₈-Fettsäure (α -Liponsäure), welche kovalent über eine Amidbindung mit einem konservierten Lysinrest (Lys⁶³) am H-Proteins verknüpft ist (Abb. 2; Douce *et al.*, 2001, Fujiwara *et al.*, 1986, 1990). Das H-Protein ist mit seinem Lipoamidarm zur Interaktion mit allen GCS-Komponenten fähig. Es durchläuft dabei einen Zyklus mit drei verschiedenen Zuständen (Abb. 3; Douce *et al.*, 2001). Nach der Beladung der oxidierten

Schwefelgruppe des Lipoamidarms mit dem verbleibenden Aminomethylen-Rest (H_{met}) dient das H-Protein als Substrat für das T-Protein (P_4 oder Aminomethyl-Transferase).

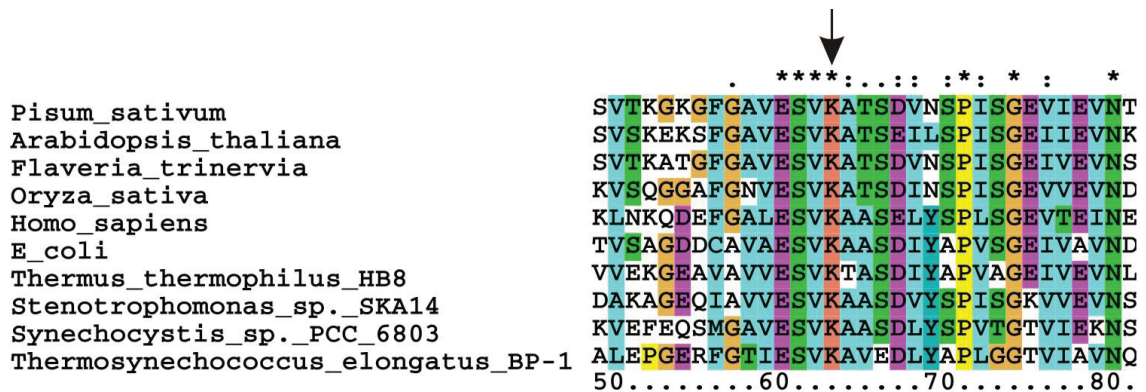


Abb. 2: ClustalX Alignment von H-Proteinen mit pro- und eukaryotischem Ursprung. Abgebildet ist der Bereich um den konservierten Lysinrest (Pfeil, Lys⁶³). *Pisum sativum* acc. nr. CAA37704, *Arabidopsis thaliana* acc. nr. NP_181080, *Flaveria trinervia* acc. nr. CAA88734, *Oryza sativa* acc. nr. NP_001065060, *Homo sapiens* acc. nr. P23434, *Escherichia coli* acc. nr. BAE76969, *Thermus thermophilus* HB8 acc. nr. YP_143790, *Stenotrophomonas* sp. SKA14 acc. nr. ZP_05135413, *Synechocystis* sp. PCC 6803 acc. nr. BAA17600, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 acc. nr. BAC09230

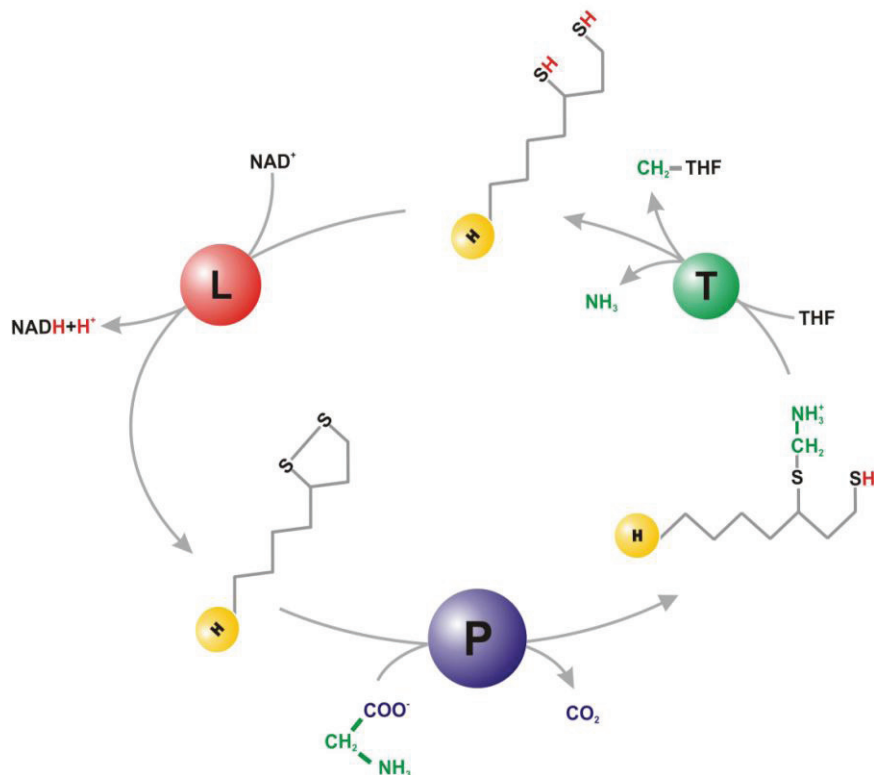


Abb. 3: Reaktionsmechanismus des GCS (Douce *et al.*, 2001). Dargestellt ist die Decarboxylierung von Glycin durch das P-Protein, die Freisetzung von NH₃ inklusive der Synthese von CH₂-THF am T-Protein, und die Reoxidation des Lipoamidarms am L-Protein.

Alle bisher untersuchten T-Proteine sind Monomere mit einer Masse von ca. 45 kD (Bauwe & Kolukisaoglu, 2003, Bourguignon *et al.*, 1988, Freudenberg & Andreessen, 1989, Kopriva, Turner *et al.*, 1995). Das THF-abhängige T-Protein katalysiert die Abspaltung des am Lipoamidarm gebundenen Aminomethylen-Rests und überträgt diesen auf THF, wobei CH₂-THF entsteht. Bei diesem Prozess wird NH₃ freigesetzt. Das H-Protein liegt nach dieser Reaktion vollständig reduziert vor. Um erneut in den Zyklus einzugehen, muss das H-Protein reoxidiert werden. Diese abschließende Reaktion findet am L-Protein statt (P₃ oder Dihydrolipoamid-Dehydrogenase), wo das reduzierte Dithiol der Liponsäuregruppe zu einer Disulfidbrücke regeneriert wird.

L-Proteine sind Homodimere mit einer Masse von ca. 100 kD (Douce *et al.*, 2001, Engels *et al.*, 1997, Mukherjee *et al.*, 2006, Serrano, 1992). Sie besitzen ein nicht-kovalent gebundenes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und zwei redoxaktive Cystein-Reste pro Untereinheit, mit deren Hilfe sie zwei Elektronen von dem reduzierten Lipoamid auf NAD⁺ bzw. NADP⁺ übertragen. Der Lipoamidarm des H-Proteins liegt nach der Reaktion oxidiert vor und steht dem P-Protein erneut als Aminomethylen-Akzeptor zur Verfügung.

Das L-Protein ist jedoch nicht nur GCS-Bestandteil, sondern auch Teil des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC), des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (KDC) und des *branched chain*- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BCKDC) (Bourguignon *et al.*, 1996, Fujiki *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 1997). Auch in diesen Enzymkomplexen katalysiert es die Oxidation von Dihydrolipoylresten. Nur in wenigen Organismen, wie z. B. *Pseudomonas putida*, gibt es weitere Dihydrolipoamid-Dehydrogenasen (LPD-val), die einem speziellen Komplex zugeordnet sind (BCKDC) (Burns *et al.*, 1989, Sokatch & Burns, 1984).

2.1.2. Allgemeine GCS-Funktion

In allen Organismen sind GCS und SHMT Teil der Glycin-Serin-Interkonversion (siehe Reaktionsgleichung, unten) und des Folatstoffwechsels (Abb. 4). In Prokaryoten ist GCS im Zytosol, in Eukaryoten in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, wo es locker gebunden an der inneren Mitochondrienmembran vorliegt (Hiraga *et al.*, 1972, Moore *et al.*, 1977, Motokawa & Kikuchi, 1971, Woo & C.B., 1977). In der Matrix pflanzlicher Mitochondrien kann die GCS-Konzentration ungefähr die Hälfte des löslichen Gesamtproteins ausmachen (Oliver *et al.*, 1990).



Über das am L-Protein synthetisierte NADH kann in der Atmungskette Energie erzeugt werden. Glycin und Serin sind Vorstufen von Proteinen, Chlorophyllen, Glutathion, Tryptophan, Phospholipiden und Ethanolamin.

Glycin fermentierende Bakterien wie der Anaerobier *Peptococcus glycinophilus* können mit GCS und SHMT Acetylphosphat bilden und über dessen Dephosphorylierung Acetat und ATP synthetisieren (Klein & Sagers, 1962). Das anaerobe Bakterium *Eubacterium acidaminophilum* verstoffwechselt ebenfalls Glycin. Hier wird mithilfe von GCS und weiterer Stoffwechselprozesse Reduktionsäquivalent erzeugt, um mit einer Glycin-Reduktase Acetylphosphat zu synthetisieren (Freudenberg & Andreesen, 1989, Zindel *et al.*, 1988). Bei Wachstum auf Serin-haltigen Medien kann dieses Bakterium unter GCS-Zuhilfenahme Glycin synthetisieren (Glycin-Synthase), welches wiederum der weiteren Reduktion durch die Glycin-Reduktase zur Verfügung steht. SHMT-Aktivität war bei diesem Bakterium bisher nicht nachweisbar. Die purinolytischen Clostridien *C. acidurici*, und *C. cylindrosporum* können Purine zu Glycin umsetzen und dies ähnlich wie *E. acidaminophilum* über GCS und SHMT oder Glycin-Reduktase verstoffwechseln. Zusätzlich ist es diesen Clostridien mithilfe des GCS auch möglich autotroph zu wachsen, in dem sie CO_2 , NH_3 und THF zu Glycin umsetzen (Gariboldi & Drake, 1984, Sagers *et al.*, 1961). Das hierzu benötigte CH_2 -THF erzeugen sie mit CO_2 über eine Formatehydrogenase und einen reduktiven THF-Weg. Interessant ist außerdem die Tatsache, dass die Bakterien, in denen GCS als Glycin-Synthase fungiert, über ein heterotetrameres P-Protein verfügen.

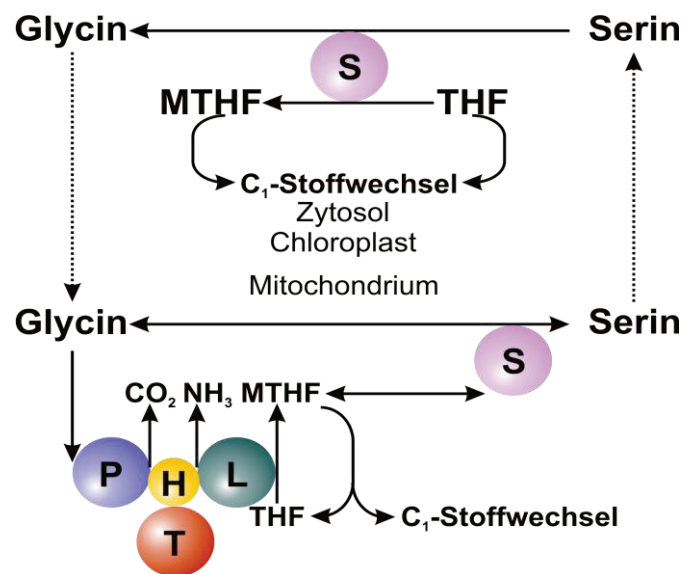


Abb. 4: Schematische Abbildung der Glycin-Serin-Interkonversion und ihre Verbindung zum C₁-Stoffwechsel in verschiedenen Zellkompartimenten. (Bauwe und Kolukisaoglu *et al.*, 2003, mod.) Die Kreise P-, T-, L- und H stellen die vier Proteine des GCS dar. Der Kreis S repräsentiert die SHMT.

2.2. GCS-Funktion in der pflanzlichen Photorespiration

In Pflanzen übernimmt GCS neben seinen Funktionen im Aminosäure- und C₁-Stoffwechsel noch eine wichtige Rolle im photorespiratorischen C₂-Zyklus. Die pflanzliche Photorespiration ist durch den Verbrauch von O_2 und die Bildung von CO_2 unter Lichteinfluss

gekennzeichnet. Sie hat den Ursprung in der Oxygenase-Aktivität der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO).

2.2.1. Die Oxygenase-Aktivität der RubisCO

RubisCO ist das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Enzym und nimmt in der Photosynthese der Pflanze eine Schlüsselposition ein (Ellis, 1979). Es katalysiert die Bindung von atmosphärischem CO_2 an Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP). RubisCO höherer Pflanzen besteht aus 8 plastidär kodierten großen (LSU = *large subunit*) und 8 kernkodierten kleinen (SSU = *small subunit*) Untereinheiten und kann nur sehr wenige CO_2 -Moleküle pro Sekunde fixieren (Andersson, 2008, Portis & Parry, 2007). Daraus resultiert, dass ausreichend große Mengen an Enzym vorhanden sein müssen, um den Aufbau an organischen Stoffen für das Wachstum und den Energiebedarf der Zelle zur Verfügung zu stellen. Die CO_2 -Fixierung durch RubisCO ist in der heutigen Atmosphäre mit einer nicht vermeidbaren Nebenreaktion verbunden, in der O_2 anstelle von CO_2 umgesetzt wird (Abb. 5). CO_2 und O_2 konkurrieren um die gleiche Bindestelle und inhibieren die jeweils andere Reaktion. Dies hat zur Folge, dass unter Standardbedingungen statistisch mit ca. jedem dritten Molekül CO_2 auch ein Molekül O_2 fixiert wird. Mit steigender Temperatur verringert sich die RubisCO-Spezifität für CO_2 (Brooks & Farquhar, 1985) und die Löslichkeit von CO_2 gegenüber O_2 in wässrigen Lösungen. Daher steigt mit zunehmender Temperatur die relative Photorespirationsrate (Sage, 2004). Dies kann bei ungünstigen Bedingungen zu einem Verlust von bis zu 50 % des in der Photosynthese fixierten Kohlenstoffs führen.

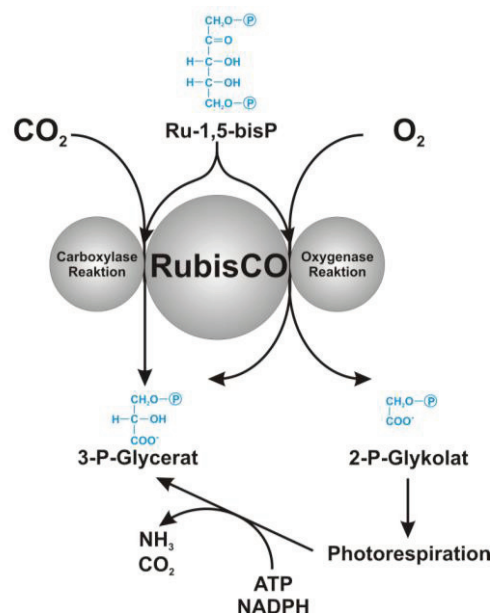


Abb. 5: Schematische Darstellung der RubisCO-Bifunktionalität. Neben der Carboxylierung katalysiert RubisCO auch die Oxygenierung von RuBP. Das in der Oxygenierungsreaktion synthetisierte 2-P-Glykolat ist für die Zelle toxisch und wird über die Photorespiration metabolisiert.

Durch die RubisCO-Oxygenase-Reaktion entsteht 2-Phosphoglykolat, welches im Prozess der Photorespiration (auch C₂-Zyklus genannt) in den Calvin-Zyklus zurückgeführt werden muss. In diesem energieaufwendigen Prozess werden zwei Moleküle 2-Phosphoglykolat unter Verbrauch von ATP zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt. Dabei wird zuvor fixiertes CO₂ freigesetzt (Reumann & Weber, 2006).

2.2.2. Der photorespiratorische C₂-Zyklus

Der C₂-Zyklus besteht aus einer komplexen Reaktionsfolge (Abb. 6), die in den Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen und im Zytosol abläuft (Douce *et al.*, 2001, Timm *et al.*, 2008, Wingler *et al.*, 2000). Im Verlauf der Reaktion wird CO₂ sowie NH₃ in den Mitochondrien freigesetzt.

Der Reaktionszyklus beginnt in den Chloroplasten mit der Dephosphorylierung des 2-Phosphoglykolats durch die Glykolatphosphatase. Das entstehende Glykolat wird anschließend im Austausch gegen 3-Phosphoglycerat in die Peroxisomen transportiert, wo es durch die Glykolatoxidase zu Glyoxylat umgesetzt wird. Bei dieser Reaktion werden Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen. Das dadurch entstehende reaktive H₂O₂ wird durch die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase zu Wasser und Sauerstoff entgiftet. Das Produkt Glyoxylat ist ebenfalls ein Zellgift, das in Chloroplasten schon in geringen Konzentrationen zu einer Inhibierung der RubisCO und der Fructose-1,6-Bisphosphatase führt (Flügge *et al.*, 1980). Darauf folgend wird Glyoxylat zu Glycin umgesetzt. Dies ist in Pflanzen über zwei Transaminierungsreaktionen möglich. Während bei der Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase (GGAT) Glutamat als Lieferant der Aminogruppe fungiert, ist es bei der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) Serin. Das Glycin wird in die Mitochondrien transportiert. Hier erfolgt die Umsetzung von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin unter Freisetzung von CO₂ und NH₄⁺ sowie der Bildung von NADH durch GCS und SHMT. Das synthetisierte Serin gelangt zurück in die Peroxisomen, wo es durch die SGAT zu Hydroxypyruvat desaminiert wird. Die anschließende Reduktion zu Glycerat erfolgt durch die NADH-abhängige Hydroxypyruvatreduktase. Nach dem Transport des Glycerats in die Chloroplasten kann das durch die Glycerat-Kinase synthetisierte 3-Phosphoglycerat wiederum in den Calvin-Zyklus eintreten.

Die GCS-Komponenten der Modellpflanze für die C₃-Photosynthese *A. thaliana* wurde in der Vergangenheit eingehend untersucht. Wie bei vielen anderen Pflanzen sind in *A. thaliana* die GCS-Proteine in kleinen Multigenfamilien kodiert (Bauwe & Kolukisaoglu, 2003). Die Ausnahme bildet hier das T-Protein, das von nur einem Gen kodiert wird (Tabelle 1).

Tabelle 1: GCS und SHMT kodierende Gene in *A. thaliana*.

kodiertes Protein	Symbol	MIPS-Nr.	Anzahl AS	Lokalisation
H-Protein	<i>AtGDH1</i>	<i>At2g35370</i>	165	Mitochondrium
	<i>AtGDH2</i>	<i>At1g32470</i>	166	Mitochondrium
	<i>AtGDH3</i>	<i>At2g35120</i>	156	Mitochondrium
P-Protein	<i>AtGDP1</i>	<i>At4g33010</i>	1037	Mitochondrium
	<i>AtGDP2</i>	<i>At2g26080</i>	1044	Mitochondrium
T-Protein	<i>AtGDT1</i>	<i>At1g11860</i>	408	Mitochondrium
L-Protein	<i>AtMLPD1</i>	<i>At3g17240</i>	507	Mitochondrium
	<i>AtMLPD2</i>	<i>At1g48030</i>	507	Mitochondrium

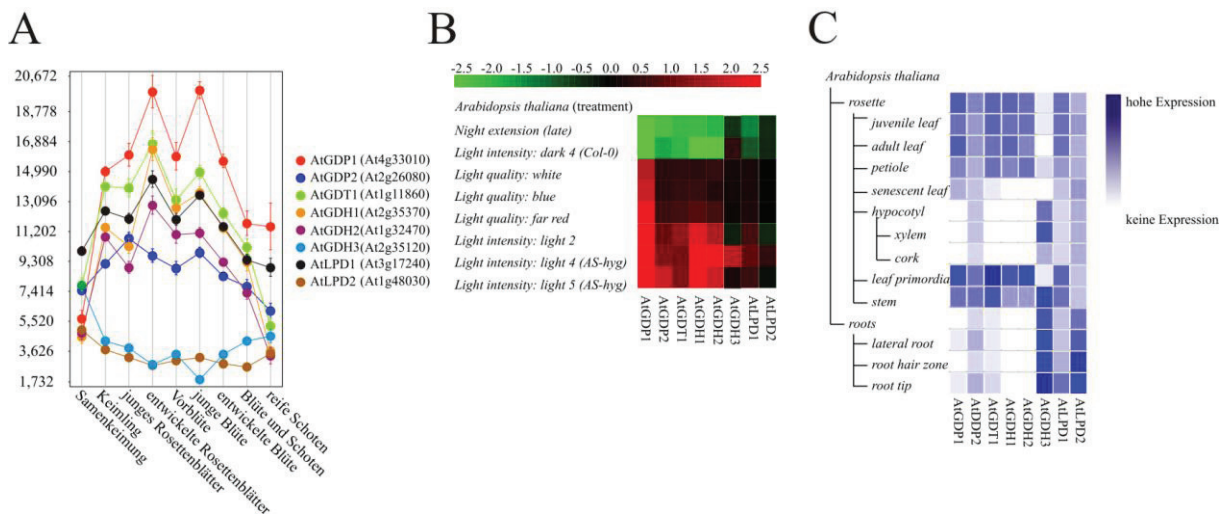


Abb. 7: In silico Auswertung der Expression von GDC-Komponenten im Modellorganismus *A. thaliana* mit dem Expressionsanalysetool GENEVESTIGATOR. A: Expression der GDC-Komponenten im Verlauf verschiedener pflanzlicher Entwicklungsstadien; B: Expression der GDC-Komponenten unter Einfluss verschiedener äußerer Lichteinflüsse; C: organspezifische Expression der GDC-Komponenten

Mit dem Internet-Tool Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) lässt sich die Expression von *Arabidopsis*-Genen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium (Abb. 7A), abiotischen Reizen (Abb. 7B) und dem pflanzlichen Gewebe analysieren (Abb. 7C). Alle an der Photorespiration beteiligten GCS-Proteine sind identisch reguliert. Kennzeichnend ist die Hochregulation der Genexpression unter Licht und eine hohe Syntheserate der GCS-Proteine in den grünen Blattorganen. *A. thaliana* besitzt zwei P-Proteine (AtGDP1 und

AtGDP2), die an der Photorespiration beteiligt und zu 90 % identisch sind (Bauwe & Kolukisaoglu, 2003). Des Weiteren kodiert das Genom von *A. thaliana* drei H-Proteine. Während AtGDH1 und AtGDH2 an der Photorespiration beteiligt sind, ist die Funktion von AtGDH3 umstritten. Das Expressionsmuster von AtGDH3 unterscheidet sich von den anderen photorespiratorischen GCS-Komponenten (Abb. 7) und durch die vorwiegende Synthese des Proteins in den heterotrophen Geweben wird eine Beteiligung am pflanzlichen C₁-Stoffwechsel postuliert (Rajinikanth *et al.*, 2007). Von den zwei im *Arabidopsis*-Genom kodierten L-Proteinen besitzt nur AtLPD1 das Expressionsmuster anderer photorespiratorischer GCS-Proteine (Abb. 7).

Die Analyse von Mutanten mit Defekten im C₂-Zyklus trug sehr zum Verständnis dieses wichtigen Stoffwechselweges bei. Diese Mutanten haben einen konditional-letalen Phänotyp und sind nicht in der Lage unter ambienten Luftbedingungen zu wachsen. Ein Wachstum dieser Pflanzen in Luft mit erhöhten CO₂-Konzentrationen ist jedoch möglich (Somerville & Ogren, 1982, Voll *et al.*, 2006). Werden Mutanten des C₂-Zyklus von erhöhten CO₂-Konzentrationen in normale Luftbedingungen transferiert, werden die Blätter innerhalb kurzer Zeit chlorotisch und die Pflanze stirbt ab (Schwarte & Bauwe, 2007, Voll *et al.*, 2006). Dies wird auch als photorespiratorischer Phänotyp bezeichnet. GCS pflanzlicher Mitochondrien besitzt auch außerhalb der Photorespiration essenzielle Funktionen. *A. thaliana* besitzt zwei P-Protein-Gene. Wird nur eines der beiden Gene ausgeschaltet, ist die Pflanze physiologisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, jedoch ist eine P-Protein-Doppelmutante selbst unter erhöhten CO₂-Konzentrationen nicht lebensfähig (Engel *et al.*, 2007).

Vor ca. 15 Jahren durchgeführte Experimente beweisen, dass GCS-Proteine aus den Blattmitochondrien der Erbse assoziiert als Komplex vorliegen, der locker an der inneren mitochondrialen Membran gebunden vorliegt (Cohen-Addad *et al.*, 1997, Oliver & Raman, 1995). Mit Filtrationsexperimenten wurde nachgewiesen, dass die GCS-Proteine eines hoch konzentrierten Mitochondrienextraktes nicht in der Lage waren, eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 300 kD zu passieren. Kein GCS-Protein überschreitet diese Molekülgröße. Selbst das homodimere pflanzliche P-Protein mit einer Masse von ca. 220 kD kann diese Membran durchqueren, wenn es nicht assoziiert in einem Komplex vorliegt (Oliver *et al.*, 1990). Die Untersuchungen ergaben eine konzentrationsabhängige GCS-Dissoziation und Assoziation. Bei Konzentrationen unter 0,25 mg/ml begannen die einzelnen GCS-Komponenten dissoziieren, während sich der Komplex bei höheren Konzentrationen wieder reformierte. Die Bindung der einzelnen Komponenten beruht deshalb wahrscheinlich auf schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen. Das stöchiometrische Verhältnis der GCS-Proteine zueinander von 2P/27H/2T/1L wurde mit ELISA-Experimenten bestimmt (Cohen-Addad *et al.*, 1997, Oliver & Raman, 1995). Legt man dies zugrunde, hat GCS aus Pflanzen eine Molmasse von ca. 1300 kD. Das Verhältnis der Komponenten zueinander ist konstant. Die externe Zugabe von GCS-Proteinen zu einem hoch konzentrierten pflanzlichen

Mitochondrienextrakt führte zu keiner Komplex-Dissoziation. Auch das stöchiometrische Verhältnis der GCS-Komponenten blieb dabei unverändert (Oliver & Raman, 1995).

Bis zum heutigen Zeitpunkt gelang es nicht, einen mitochondrialen GCS-Proteinkomplex in einem assoziierten Zustand zu reinigen. Deshalb ist über die GCS-Struktur bisher wenig bekannt und über den Aufbau des vermeintlichen Komplexes kann nur spekuliert werden. Die Bildung von binären Komplexen zwischen H- und P-Proteinen sowie H- und T-Proteinen wurde beobachtet (Cohen-Addad *et al.*, 1997, Oliver *et al.*, 1990). Auch das Vorkommen von H-Proteinen als Monomer oder Dimer ist bereits publiziert (Oliver, 1994). Das bisherige Strukturmodell zum Aufbau pflanzlicher GCS beinhaltet deshalb einen strukturellen Kern von vielen H-Protein-Dimeren, der den kompletten Komplex zusammenhält. An diesen Kern lagern sich alle restlichen GCS-Proteine an.

3. Zielstellung der Arbeit

Trotz der zentralen Bedeutung des GCS in allen lebenden Organismen bleiben viele Fragen unbeantwortet. Die Konzentration der GCS-Proteine in Prokaryoten und vielen Mitochondrien nicht-grüner Gewebe ist äußerst gering. Nach den Ergebnissen der Filtrationsexperimente müssten deshalb die GCS-Proteine in einem dissoziierten Zustand vorliegen. Diese Vorstellung steht in Konflikt mit den hohen GCS-Flussraten, z. B. bei *E. coli* (Wilson *et al.*, 1993), die möglicherweise nur schwerlich mit frei dissoziierten GCS-Komponenten und Zwischenprodukten erreichbar wären. Strukturmodelle von GCS-Proteinen oder Co-Kristallisationen von zwei oder mehr Komponenten könnten Einblick in den Aufbau des Komplexes geben. In der PDB-Datenbank (*Protein Data Bank*) gibt es bereits Strukturmodelle von GCS-Proteinen. Es gibt bisher nur eine bekannte P-Protein-Struktur aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* HB8 (Nakai *et al.*, 2005). Dieses Protein hat einen $(\alpha,\beta)_2$ -heterotetrameren Aufbau und ClustalX-Analysen lassen vermuten, dass sich der Aufbau des heterotetrameren Enzyms von den homodimeren P-Proteinen unterscheidet (Hasse *et al.*, 2010).

Evolutionäre Untersuchungen ergaben, dass bis zu 18 % des Kerngenoms der Modellpflanze *Arabidopsis* von dem cyanobakteriellen Endosymbionten stammen (Martin *et al.*, 2002). Cyanobakterielle P-Proteine haben wie die pflanzlichen Glycin-Decarboxylasen einen homodimeren Aufbau. Das P-Protein aus dem Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 lässt sich in großen Mengen als rekombinantes, biochemisch aktives Enzym gewinnen (Hasse *et al.*, 2007). Die Aufklärung der Struktur eines cyanobakteriellen homodimeren P-Proteins würde deshalb neue Einsichten in die Funktionsweise homodimerer Glycin-Decarboxylasen ermöglichen und könnte damit zusätzliche Hinweise zum strukturellen Aufbau eines eukaryotischen GCS-Komplexes liefern. Deshalb sollten in dieser Arbeit folgende Aspekte betrachtet werden:

Biochemische Charakterisierung des rekombinanten homodimeren P-Proteins aus Synechocystis sp. PCC 6803.

Bis heute gelang keine heterologe Expression eines aktiven eukaryotischen P-Proteins. Die Glycin-Decarboxylase aus *Synechocystis* besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu eukaryotischen P-Proteinen und kann rekombinant erhalten werden. In Experimenten soll untersucht werden, ob die Biochemie der rekombinanten P- und H-Proteine aus *Synechocystis* denen der GCS-Komponenten eukaryotischer Mitochondrien ähnelt.

Interagiert das cyanobakterielle P-Protein mit eukaryotischen H-Proteinen?

In weiteren Experimenten soll analysiert werden, ob eine biochemische Interaktion des cyanobakteriellen P-Proteins mit pflanzlichen H-Proteinen oder dem menschlichen H-Protein möglich ist. Vergleiche der erhaltenen Parameter des Mischsystems mit dem cyanobakteriellen System sollen aufzeigen, ob sich das P-Protein zur Charakterisierung von eukaryotischen Glycin-Decarboxylasen eignet. Von besonderem Interesse unter den homodimeren Enzymen ist, neben den an der Photorespiration teilnehmenden pflanzlichen P-Proteinen, das P-Protein aus *H. sapiens*. Dessen Mutation führt häufig zu einer schweren humanen Erberkrankung (nichtketotische Hyperglycinämie, NKH). Sollte sich humane H-Protein ein geeignetes Substrat für das *Synechocystis* P-Protein herausstellen, könnten die Effekte von Mutationen im humanen P-Protein mit dem viel leichter verfügbaren cyanobakteriellen Enzym studiert werden.

Kristallisation und Strukturermittlung des homodimeren P-Proteins aus Synechocystis.

Die Kristallisation von Proteinen erfordert das Suchen nach geeigneten Bedingungen, denen man sich in zahlreichen Experimenten annähern muss. Dies erfordert die Bereitstellung ausreichender Mengen an *Synechocystis* P-Protein, dessen Synthese und Reinigung ohne größere Probleme möglich ist. Die Experimente zur Kristallisation und Strukturermittlung des P-Proteins erfolgten in Kooperation Frau Prof. Inger Andersson der *University of Agricultural Sciences* in Uppsala.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Verwendete DNA-und Proteingrößenstandards

Tabelle 2: Verwendete DNA-Größenstandards und Reaktionskits

Größenstandard	Hersteller
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
PUC-Mix Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
LMW-SDS Marker Kit	GE Healthcare (Uppsala, SE)

4.1.2. Oligonukleotide

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Oligonukleotide (fw: *sense* Primer, *antisense* Primer)

Primer	Sequenz 5'→3'	Verwendungszweck
P6803 <i>XhoI</i> fw	<u>CTCGAGAT</u> GCCCAACCTAGAG	Expression von <i>slr0293</i> (P-Protein) in pBAD-HisA
P6803 <i>PvuII</i> rev	<u>GAATTCT</u> CAATAAATTTCTC	Expression von <i>slr0293</i> (P-Protein) in pBAD-HisA
H6803 <i>NdeI</i> fw	<u>CATATG</u> GAACTGGAACATCC	Expression von <i>slr0879</i> (H-Protein) in pET-28a
H6803 <i>BamHI</i> rev	<u>GGATCC</u> CTAATCTCCCGTCTC	Expression von <i>slr0879</i> (H-Protein) in pET-28a
1096 <i>XhoI</i> fw	<u>CTCGAGAT</u> GAGTCAGGATTTT	Expression von <i>slr1096</i> (L-Protein) in pBAD-HisA
1096 <i>EcoRI</i> rev	<u>GAATTCT</u> TAAACCGCCCGTTT	Expression von <i>slr1096</i> (L-Protein) in pBAD-HisA
AtGLDH1 <i>NdeI</i> fw	<u>CATATG</u> TCCACAGTTTTGGA	Expression von AtGLDH1 (H-Protein aus <i>A. thaliana</i>) in pET-28a
AtGLDH1 ^{AA} <i>NdeI</i> fw	<u>CATATG</u> TCCACAGCTGCAGTTTTGGA	Expression von AtGLDH1 (H-Protein aus <i>A. thaliana</i>) in pET-28a
AtGLDH1 <i>BamHI</i> rev	<u>GGATCC</u> CTAGTGAGCAGCATCT	Expression von AtGLDH1 (H-Protein aus <i>A. thaliana</i>) in pET-28a

LPL-A <i>Nde</i> I fw	<u>CATATGTCCACATTACGCCTGCT</u>	Expression der LPL-A aus <i>E. coli</i> in pET-28a
LPL-A <i>Hind</i> III rev	<u>AAGCTTCTACCTTACAGCCCCCG</u>	Expression der LPL-A aus <i>E. coli</i> in pET-28a
H-Thermo <i>Nde</i> I fw	<u>CATATGACACTCACCTATCCT</u>	Expression von <i>tlr1476</i> (H-Protein aus <i>T. elongatus</i>) in pET-28a
H-Thermo <i>Bam</i> HI rev	<u>GGATCCCTACGATCCTTCCAC</u>	Expression von <i>tlr1476</i> (H-Protein aus <i>T. elongatus</i>) in pET-28a
H-Human <i>Nhe</i> I fw	<u>GCTAGCTCGGTGCGTAAATTC</u>	Expression des H-Proteins aus <i>H. sapiens</i> in pET-28a
H-Human <i>Xho</i> I rev	<u>CTCGAGCTACTCCTCAATAGA</u>	Expression des H-Proteins aus <i>H. sapiens</i> in pET-28a

4.1.3. Synthetisierte Plasmide

Die Herstellung der in dieser Dissertation angefertigten Plasmide ist im Anhang dieses Manuskriptes beschrieben. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide verwendet und die erstellten Plasmide mittels PCR und Restriktionsanalysen überprüft. Des Weiteren wurde die korrekte Sequenz der inserierten DNA durch Sequenzierung verifiziert. Die Plasmidkarten sind ebenfalls dem Anhang dieser Dissertation angefügt (9.4).

4.1.4. Bakterienkulturen und Kultivierungsmedien

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich Bakterienstämme der Art *E. coli* verwendet. Die Kultivierung von *E. coli* zum Zweck der DNA-Klonierung erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Platten (Maniatis *et al.*, 1982). Zur Proteinexpression wurde das Vollmedium 2YT verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Für die Expression von Selenomethionin-markiertem P-Protein wurde ein modifiziertes M9-Medium verwendet. Um eine Proteinexpression mit dem pBAD-System zu ermöglichen, wurde als C-Quelle Glycerol anstelle von Glucose verwendet. Das zur Vorkultivierung genutzte M9-Medium (Maniatis *et al.*, 1982) unterscheidet sich von dem zur Proteinexpression verwendeten M9-Medium (Tabelle 4). Letzterem wurden Arabinose zur Induktion der Proteinexpression und verschiedene Aminosäuren beigelegt.

Tabelle 4: M9-Medium zur Proteinexpression

M9-Medium (Maniatis *et al.*, 1982)

Glycerol	0,4 % (w/v)
L-Lysin	100 mg
L-Phenylalanin	100 mg

L-Threonin	100 mg
L-Isoleucin	50 mg
L-Leucin	50 mg
L-Valin	50 mg
L-Selenomethionin	60 mg
Arabinose	2 g

4.1.5. Medienzusätze

Bei Bedarf wurden den Medien die in Tabelle 5 aufgeführten Zusätze beigemischt.

Tabelle 5: Zusätze für Kultivierungsmedien

Medienzusatz	Stammlösung	Konzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100 % Ethanol	30 µg/ml
Anhydrotetracyclin	20 mg/ml in DMF	0,2 µg/ml
PLP	10 mM in H ₂ O	0,2 mM
IPTG	1 M	1 mM
X-Gal	20 mg/ml in DMF	50 µg/ml
α-Liponsäure	50 mg/ml in 100 % Ethanol	50 µg/ml

Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

4.2. Methoden

4.2.1. Mikrobiologische Methoden

4.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* zur Plasmid-Transformation

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem modifizierten Standardprotokoll (Hanahan, 1983). Hierzu wurde eine *E. coli* Übernachtskultur in Ψ-Medium (Tabelle 6) mit einer Einzelkultur eines Rezipientenstammes beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1 ml dieser Übernachtskultur wurde in 100 ml Ψ-Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,48 (OD₅₅₀) geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in einem Eisbad schockgeköhlt und für weitere 10 min bei 0 °C inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 4 °C (5 min, 3000 U/min) erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in 30 ml eiskaltem Puffer TJB1 (Tabelle 7). Nach einer weiteren Inkubation bei 0 °C (5 min) fand ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4 °C

(5 min, 3000 U/min) statt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 4 ml eiskaltem TJB2-Puffer (Tabelle 7) gelöst, aliquotiert (100 µl), sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 6: Medium zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Ψ-Medium	
Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
MgSO ₄	0,4 %
KCl	10 mM

Tabelle 7: Puffer zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

TJB1		TJB2	
RbCl	10 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂ x 4H ₂ O	50 mM	RbCl	10 mM
K-Acetat	30 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O	75 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	10 mM	Glycerol	15 %
pH 5,8, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C		pH 7,0, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C	

4.2.1.2. Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zu den auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen (100 µl) wurde ein vollständiger Ligationsansatz (20 µl) oder 1 µg Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 100 Sekunden bei 42 °C wurden die Zellen für 5 min auf Eis gekühlt und danach mit 1 ml LB-Medium versetzt. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden 50-1000 µl des Ansatzes auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1. Schnelle Isolierung von genomischer DNA für PCR-Analysen

Von den auf Selektionsmedien gewachsenen Bakterienkolonien wurde mit einem sterilen Zahnstocher Zellmaterial entfernt, in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert und anschließend 5 min bei 100 °C gekocht. Dieser Schritt führt zur Zelllyse und damit zur Freisetzung der DNA, die für PCR-Analysen eingesetzt wurde.

4.2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) und das illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE-Healthcare, Uppsala, SE) nach den Angaben der Hersteller benutzt. Als Ausgangsmaterial für die Isolierung dienten 3 ml einer bakteriellen Übernachtskultur.

4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 8: Puffer und Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese

5 x TBE-Puffer (1 Liter)		5 x Stopplösung	
Tris/HCl pH 8,0	54 g	EDTA	0,1 M
Borsäure	27,5 g	Glycerol	40 %
0,5 M EDTA pH 8	20 ml	SDS	0,1 %
CaCl ₂ x 2H ₂ O	10 mM	Bromphenolblau	0,025 %

Der Agarosegehalt der Gele betrug, in Abhängigkeit von der Fragmentgröße, 0,8-1,5 % (w/v). Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 0,5 x TBE (Tabelle 8). Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden die DNA-Proben mit 5 x Stopplösung (Tabelle 8) vermischt. Um die Größe und Konzentration der DNA-Fragmente abschätzen zu können, kam ein DNA-Marker (Tabelle 2) zum Einsatz.

4.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche von Nukleinsäuren wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Mullis *et al.*, 1992). Ein typischer PCR-Ansatz, wie er zur Amplifikation verwendet wurde, setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 9: Zusammensetzung eines Standard PCR-Ansatzes

Komponente	Konzentration
PCR-Mastermix (Qiagen, Hilden)	1x
Primer A	5 pmol (5 µM)
Primer B	5 pmol (5 µM)
DNA-Template	0,2 pg-2 ng
H ₂ O	ad. 10 µl

4.2.3.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode zur schnellen Überprüfung von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines Plasmids, eines DNA-Inserts oder einer Mutation. Für die Kolonie-PCR wurde die DNA der Bakterienkolonien wie unter Punkt 4.2.2.1 beschrieben isoliert und ein PCR-Ansatz durchgeführt.

4.2.4. DNA-Klonierung

4.2.4.1. TA-Klonierung

Das in dieser Arbeit verwendete Reaktionskit für die TA-Klonierung war das pGEM[®]-T Vektor System (Promega, Mannheim). In dem bereits linearisiert vorliegenden pGEM-T Vektor mit 3'-dT-Überhängen wurden die mit der Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Fragmente über Nacht bei 4 °C ligiert und anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* transformiert. Die Transformation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2.4.2. Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Für die standardmäßig durchgeführte Ligation zweier DNA-Fragmente wurden diese nach folgendem Schema (Tabelle 10) in einem molaren DNA-Fragment/Vektor-Verhältnis von 5:1 gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das eingesetzte DNA-Fragment und der verwendete Vektor wurden dafür in der Regel mittels Gelelektion aufgereinigt. Nach der Transformation der Ligationsansätze in chemisch kompetente *E. coli* wurden diese auf Selektionsplatten ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 10: Ligationsansatz mit der T4-Ligase

Komponente	Menge
Insert/Vektor	1:5
10 x Ligase-Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

4.2.5. Isolierung von Mitochondrien aus *P. sativum*

P. sativum wurde in einem Gewächshaus in kommerziell erwerblicher Blumenerde angezogen. Für die Isolierung der Mitochondrien wurden 50 g Pflanzenmaterial (Blatt und Stamm) von 2-3 Wochen alten Pflanzen geerntet und wie beschrieben gereinigt (Douce *et al.*, 1987).

4.2.6. Proteinbiochemische Methoden

4.2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE zum denaturierenden Auftrennen der Proteine wurde nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Es handelt sich dabei um eine diskontinuierliche Elektrophorese, da zwischen einem Sammelgel und einem Trenngel unterschieden wird.

4.2.6.2. SDS-PAGE mit dem PhastSystem™ (GE Healthcare, Uppsala, SE)

Das PhastSystem™ ermöglicht die schnelle und automatische Durchführung einer SDS-PAGE, nativen PAGE und isoelektrischen Fokussierung. Die für dieses System verwendeten Gele und Pufferstrips können vom Hersteller erworben werden. Die aktive Kühlung des Elektrophoresebereichs ermöglicht die Anwendung sehr hoher Spannungen, wodurch die Dauer der Elektrophorese minimiert wird. Zur Anfertigung einer SDS-Gelelektrophorese wurde ein PhastGel Gradient 8-25 % (GE Healthcare, Uppsala, SE) und PhastGel buffer strips-SDS (GE Healthcare, Uppsala, SE) verwendet.

4.2.6.3. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE)

Zum Nachweis der vollständigen Lipoylierung des H-Proteins wurde eine native PAGE durchgeführt, mit der es möglich ist, Proteine nach Ladung und Größe aufzutrennen. Da H-Apo- und Holo-Proteine durch die Modifikation des Lysinrests eine Ladungsdifferenz aufweisen, ist eine Auftrennung in einer nativen PAGE möglich. Die Proteine müssen während der elektrophoretischen Trennung ihre native Konformation behalten. Deshalb enthielten die verwendeten Lauf- als auch Probenpuffer keine denaturierenden Agenzien wie β -Mercaptoethanol und SDS. Aus diesem Grund wurde ebenfalls auf das Aufkochen der Proben vor der Gelapplikation verzichtet. Für die Durchführung der Elektrophorese wurde eine Stromstärke von 12 mA gewählt.

4.2.6.4. Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau G250

Die Coomassie-Färbung dient zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen. Hierzu wurde das Gel für 30 min in der Färbelösung angefärbt und die Proteine fixiert. Nach der Inkubation in einer Entfärbelösung wurde das Gel über Nacht in H_2O geschüttelt und anschließend für die weitere Verwendung in Folie eingeschweißt oder dokumentiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Lösungen zum Anfärben und Entfärben von Polyacrylamid-Gelen

Färbelösung	Konzentration
Methanol	40 %
Essigsäure	10 %
Coomassie Brilliant Blau G250 (w/v)	0,25 %

Entfärbungslösung	Konzentration
Methanol	50 %
Essigsäure	10 %

4.2.6.5. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (*semi-dry*)

Ein Western-Blot ermöglicht den Nachweis eines Einzelproteins mittels Antikörper in einem Proteingemisch. Hierfür muss das Proteingemisch in einer SDS-PAGE (4.2.6.1) elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (HybondTM, Fa. Amersham, Freiburg) unter Verwendung von Transferpuffer (Tabelle 12) übertragen werden. Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau-Rot-Lösung (Tabelle 13) angefärbt. Hierfür wurde die Membran 2 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend mehrmals mit H₂O gespült, bis die Proteine als rote Banden sichtbar wurden. Im Anschluss an die Ponceau-Färbung erfolgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Antikörpern.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Blotpuffers zum Transfer von Proteinen auf eine Membran

10 x Transferpuffer	Konzentration	1 x Transferpuffer	Volumen
Tris/HCl pH 7,5	0,48 M	10 x Transferpuffer	80 ml
Glycin	0,39 M	Methanol	200 ml
SDS (w/v)	0,37 %	H ₂ O	720 ml

Tabelle 13: Zusammensetzung der Ponceau-Rot-Färbelösung

Ponceau-Rot-Färbelösung	Konzentration
Ponceau S (w/v)	2 %
Trichloressigsäure (w/v)	3 %

4.2.6.6. Antikörperreaktionen

Im Anschluss an den Proteintransfer und die Ponceau-Färbung wurde die Nitrozellulosemembran für 2 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer schüttelnd inkubiert, um freie Stellen der Membran mit Protein zu sättigen. Der gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtete primäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:3000 im Blockierungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Zur Entfernung des unspezifisch gebundenen Antikörpers wurde die Membran dann zweimal für 10 min mit TBST-T auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem in TBS verdünnten (1:5000), mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers für 2 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran mit TBS-T (4 x 5 min) und TBS (1 x 10 min) gewaschen.

Tabelle 14: Puffer und Lösungen für die Antikörperreaktion

Blockpuffer	Konzentration	TBS-T	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	50 mM	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
Magermilchpulver	5 %	Triton X-100	0,1 %

TBS	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

4.2.6.7. Alkalischer Phosphatase-Nachweis

Zur finalen Entwicklung der Membran wurde diese für mehrere Minuten in Detektionspuffer (Tabelle 15) inkubiert, anschließend mit Färbelösung (Tabelle 15) bedeckt und für 5-60 min im Dunkeln entwickelt. Zum Abstoppen der Entwicklung wurde die Membran in H₂O überführt, danach zwischen Filterpapier getrocknet und das Ergebnis dokumentiert.

Tabelle 15: Puffer und Lösungen für die Antikörperreaktion

Detektionspuffer	Konzentration	Färbelösung	Volumen
Tris/HCl pH 9,5	100 mM	Detektionspuffer	10 ml
NaCl	100 mM	NBT-BCIP-Lösung	200 µl
MgCl ₂	50 mM		

NBT-BCIP-Lösung	Menge
NBT	94 mg
BCIP	47 mg
DMSO	3,35 ml
H ₂ O	1,65 ml

4.2.6.8. Heterologe Synthese von Proteinen für biochemische Analysen

Die untersuchten pro- und eukaryotischen Proteine wurden durch heterologe Expression in *E. coli* gewonnen. Hierzu wurden die Gene der jeweiligen Proteine in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und in den Wirtsorganismus transformiert. Als Kultivierungsmedien wurden LB und 2YT verwendet. Für die Expression von H-Holoproteinen wurden dem Medium 0,24 mM α -Liponsäure zugesetzt. Zur Gewinnung der Proteine wurden Expressionskulturen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Temperatur auf 20 °C verringert und die Expression induziert. Die Kulturen wurden über Nacht weiter kultiviert und anschließend geerntet.

4.2.6.9. Heterologe Synthese von Proteinen zur Proteinkristallisation

Die Expressionsstämme zur Synthese von Proteinen für biochemische Analysen und zur Proteinkristallisation waren identisch. Als Expressionsmedium wurde 2YT verwendet. Zur Gewinnung der Proteine wurden Expressionskulturen mit einem Volumen von 8 Litern in einem temperierbaren Inkubator bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ kultiviert. Im Anschluss wurden die Kulturen bei 4 °C inkubiert, bis die Temperatur des Kultivierungsmediums 20 °C betrug. Anschließend wurde die Expression induziert und die Kulturen bei 16 °C im Inkubator für weitere 16 h kultiviert und darauf folgend geerntet.

4.2.6.10. Synthese von Selenomethionin-markiertem P-Protein

Bei der Röntgenstrukturanalyse wird ein Beugungsmuster des zu untersuchenden Proteinkristalls erhalten. Bei dieser Methode gehen die Phaseninformationen der auf dem Detektor aufgetroffenen Röntgenstrahlen verloren, während die Informationen zur Frequenz und Amplitude aus dem Beugungsmuster erhalten werden können. Zur Erzeugung der Elektronendichtekarte werden die Phaseninformationen der Röntgenstrahlen jedoch benötigt. Um dieses Problem zu lösen, werden Proteine mit Schwermetallatomen markiert.

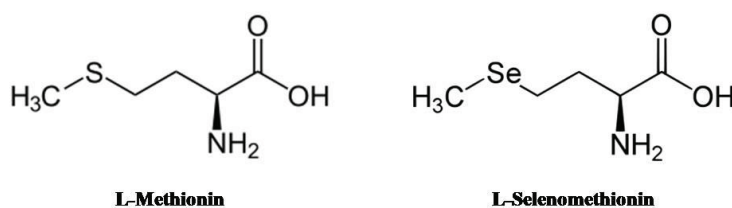


Abb. 8: Vergleich der Aminosäuren Methionin und Selenomethionin

Eine häufig angewandte Methode ist die Substitution der im Protein vorkommenden Methionine durch Selenomethionin. In Selenomethionin tritt anstelle des Schwefelatoms das Schwermetallatom Selen (Abb. 8). Hierzu muss der Expressionsstamm in einem definierten Medium angezogen werden, welches dem Bakterium extern Selenomethionin zur Verfügung stellt. Dieses wird aufgenommen und in die heterolog synthetisierten Proteine eingebaut. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Konformationen des nativen Proteins und des Substitutionsproteins identisch sind. Für die Erzeugung des Selenomethionin-markierten P-Proteins wurde der Expressionsstamm BL21(AI) verwendet. Als Kultivierungsmedium kam das modifizierte M9-Medium zum Einsatz. Als Kohlenstoffquelle diente Glycerol. Dies ermöglicht im Gegensatz zu Glukose eine Induktion des Promotors mit Arabinose.

Aus einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur (6 ml) des Expressionsstammes BL21(AI) hergestellt, der das Plasmid pBAD-*slr0293* enthielt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 1 in 2YT-Medium. Die Vorkultur wurde anschließend bei 4 °C inkubiert, darauf folgend in 500 ml M9 Medium inokuliert und bei 37 °C bis $OD_{600} = 0,6$ inkubiert. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 4 °C in der Kühlkammer gelagert. Mit jeweils 100 ml der M9-Vorkultur wurden am nächsten Tag 4 x 2 Liter M9-Medium beimpft. Diese finalen Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert und bei 4 °C gelagert, bis die Temperatur des Mediums auf 20 °C gefallen war. Während der Kühlung wurden dem M9-Medium Aminosäuren beigemischt (Tabelle 4).

Danach wurde die Kultur für weitere 30 min bei 20 °C im Inkubator inkubiert. Die Expression des P-Proteins wurde durch Zusatz von 4 g L-Arabinose in 2 Liter Expressionskultur induziert. Die Kulturen wurden anschließend für weitere 16 h bei 20 °C kultiviert und geerntet.

4.2.6.11. Aufreinigung von pflanzlichen H-Proteinen ohne Affinitätstag zur Aktivitätsbestimmung

H-Proteine sind saure Proteine. Dies wurde zur Aufreinigung von H-Proteinen ohne Affinitätstag genutzt, da ein großer Teil der Fremdproteine eines Gesamtextrakts bereits nach einer Ionenaustauschchromatografie entfernt werden konnten. Zu Beginn der Aufreinigung wurde das Bakterienpellet in 20 mM Bis-Tris-Puffer pH 6 resuspendiert, mit Ultraschall aufgeschlossen, zentrifugiert (SS34, 20000 U/min, 4 °C, 30 min) und der erhaltene Überstand mit einem Rotabilo®-Spritzenfilter (0,2 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) filtriert. Für die anschließenden FPLC-Chromatografien wurde ein ÄKTAprime™ plus FPLC-System genutzt. Der filtrierte Gesamtextrakt wurde mit einer Flussrate von 4 ml/min auf eine mit Q-Sepharose™ (GE Healthcare, Uppsala, SE) befüllte Säule (30 ml) aufgetragen, die vor der Anwendung mit Bis-Tris-Puffer pH 6 äquilibriert wurde. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0-0,5 M NaCl über ein Volumen von 400 ml.

Die Fraktionen wurden anschließend vereinigt und auf ein Volumen von 1 ml mit Vivaspın-20 Säulen (5 kD, GE Healthcare, Uppsala, SE) eingengt. Das Konzentrat wurde danach auf eine Größenausschlusssäule aufgetragen. Für diesen Reinigungsschritt wurde die 16/60 HiPrep™ Sephacryl™ S-100 Säule (GE Healthcare, Uppsala, SE) verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Fraktionen, welche H-Proteine enthielten, wurden anschließend vereinigt und das H-Protein mit Vivaspın-20 Säulen konzentriert. Zur Lagerung wurden die Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.6.12. Reinigung von *Synechocystis* P-Protein zur Aktivitätsbestimmung

Das Zellpellet wurde in Homogenisationspuffer (Tabelle 16) resuspendiert und anschließend in einem Eisbad mit der Ultraschallspitze aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 U/min entfernt (4 °C, SS34). Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Für die IMAC wurde Ni²⁺-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, SE) verwendet. Hierzu wurden 4 ml Ni²⁺-Sepharose (50 %) in Chromatographiesäulchen gefüllt und mit Homogenisationspuffer äquilibriert. Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde anschließend in die vorbereiteten Säulchen gefüllt. Nachdem dieser vollständig durchgelaufen war, wurden unspezifisch gebundene Proteine durch einen Waschschrift entfernt. Hierzu wurde ein Säulenvolumen (CV) Waschpuffer (Tabelle 16) verwendet. Nach dem Waschen der Ni²⁺-Sepharose erfolgte die Elution mit 3 x 1 ml Elutionspuffer (Tabelle 16). Die erhaltenen Eluate wurden anschließend mit Vivaspın-20 Säulen konzentriert und mit PD-10 Säulchen nach Angaben des Herstellers in 20 mM Tris/HCl pH 7,8 umgepuffert. Zur Lagerung wurde das P-Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 16: Puffer zur Reinigung von P-Protein für Aktivitätsbestimmungen

Homogenisationspuffer	Konzentration	Waschpuffer	Konzentration
Na-Phosphat pH 7,8	20 mM	Na-Phosphat pH 7,8	20 mM
NaCl	500 mM	NaCl	500 mM
Imidazol	40 mM	Imidazol	80 mM
β -Mercaptoethanol	15 mM	β -Mercaptoethanol	15 mM
PLP	200 μ M	PLP	200 μ M

Elutionspuffer	Konzentration
Na-Phosphat pH 7,8	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
β -Mercaptoethanol	15 mM
PLP	200 μ M

4.2.6.13. Reinigung von *Synechocystis* P-Proteinen zur Kristallisation

Der durchgeführte Aufschluss, die Zentrifugation und die IMAC waren identisch zur Aufreinigung des *Synechocystis* P-Proteins. Die verwendeten Homogenisationspuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer wiesen ebenfalls die gleiche Zusammensetzung auf, jedoch wurde kein Pyridoxalphosphat zugefügt (Tabelle 16). Nach der Elution wurden die erhaltenen Proteinlösungen vereinigt und durch Zentrifugation mit Vivaspin-20 Säulchen (GE, Healthcare, Uppsala, SE) konzentriert. Die anschließende Umpufferung in Tris-Puffer A (Tabelle 17) erfolgte durch Nutzung von PD-10 Säulen. Für die darauf folgend durchgeführten FPLC-Schritte wurde das ÄKTA™-Purifier-System verwendet. Das Tris-gepufferte P-Protein wurde nun an eine mit Tris-Puffer A äquilibrierte MonoQ-Säule (8 ml, GE Healthcare, Uppsala, SE) gebunden und anschließend mit Tris-Puffer B eluiert. Hierfür wurde ein linearer Konzentrationsgradient von 0-50 % Tris-Puffer B über ein Volumen von 20 CVs gewählt. Die Fraktionen der P-Protein enthaltenden Peaks wurden vereinigt und mit Vivaspin-20 Konzentratoren auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt. Anschließend wurde eine Größenausschlusschromatografie mit einer HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade-Säule (GE Healthcare, Uppsala, SE) durchgeführt, die vor dem Auftragen des P-Proteins mit Tris-Puffer C äquilibriert wurde. Die P-Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Anschließend erfolgte eine Konzentration des Proteins mit Vivaspin-20 Säulen auf 40 mg/ml. Das P-Protein-Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Tabelle 17: Puffer zur Reinigung und Lagerung von P-Protein zur Kristallisation

Tris-Puffer A	Konzentration	Tris-Puffer B	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	50 mM	NaCl	1 M
β -Mercaptoethanol	5 mM	β -Mercaptoethanol	5 mM

Tris-Puffer C	Konzentration
Na-Phosphat pH 7,8	20 mM
NaCl	500 mM
β -Mercaptoethanol	10 mM

4.2.6.14. Aufreinigung von pro- und eukaryotischen H-Proteinen mit Histidin-Tag zur Aktivitätsbestimmung

Die Zellkulturen wurden in Homogenisationspuffer (Tabelle 16) resuspendiert und mit einer Ultraschallspitze aufgeschlossen. In der anschließend durchgeführten Zentrifugation (SS34, 20000 U/min, 4 °C, 30 min) wurden die Zelltrümmer entfernt und der Überstand in mit 4 ml Ni^{2+} -Agarose (50 %, Invitrogen, Leck, NL) gefüllte und mit Homogenisationspuffer äquilibrierte Chromatografiesäulen überführt. Im Anschluss daran erfolgte ein Waschschriff mit einem CV Waschpuffer (Tabelle 18), um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Nach dem Waschen der Säulchen erfolgte die Elution mit 3 x 1 ml Elutionspuffer (Tabelle 18). Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, anschließend mit Vivaspin-20 Säulen konzentriert und mit PD-10 Säulchen nach Angaben des Herstellers in 20 mM Tris/HCl pH 7,8 umgepuffert. Zur Lagerung wurden die H-Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Alle durchgeführten Aufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Tabelle 18: Puffer zur Reinigung und Lagerung von H-Proteinen für Aktivitätsbestimmungen

Homogenisationspuffer	Konzentration	Waschpuffer	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	50 mM	NaCl	1 M
Imidazol	10 mM	Imidazol	20-40 mM

Elutionspuffer	Konzentration
Na-Phosphat pH 7,8	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	300 mM

4.2.6.15. Reinigung des *Synechocystis* L-Proteins mit Histidin-Tag zur Kristallisation

Zur Reinigung des L-Proteins wurde Protokoll zur Aufreinigung des *Synechocystis* P-Proteins (4.2.6.13) verwendet. Den Puffern wurde jedoch kein Reduktionsäquivalent in Form von β -Mercaptoethanol zugesetzt. Das Protein wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.6.16. Aufreinigung der *E. coli* Lipoatligase-A (LPL-A) mit Histidin-Tag zur *in vitro* Lipoylierung von H-Proteinen

Das zur Reinigung genutzte IMAC-Protokoll entspricht der beschriebenen Aufreinigung des *Synechocystis* P-Proteins (4.2.6.13). Den verwendeten Puffer waren identisch, es wurde jedoch kein PLP zugesetzt. Des Weiteren wurden alle Puffer entgast, da die LPL-A sehr oxidationsempfindlich ist. Die eluierte LPL-A wurde vereinigt und mit Vivaspin-20 Säulen konzentriert. Danach fand die Umpufferung in LPL-A Lagerpuffer unter Verwendung von PD-10 Säulen statt (Tabelle 19). Das Protein wurde anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 19: Puffer zur Lagerung von *E. coli* LPL-A

LPL-A Lagerpuffer	Konzentration
Na-Phosphat pH 7	20 mM
NaCl	50 mM
β -Mercaptoethanol	15 mM
Glycerol	50 %

4.2.6.17. Erstellung einer Eichgeraden zur Bestimmung der Molmassen von Proteinen mittels Größenausschlusschromatografie

Um die Molekülgrößen von Proteinen anhand einer Größenausschlusschromatografie bestimmen zu können, muss vorher eine für die Methode geeignete Säule mit Proteinen geeicht werden, deren Molmassen bekannt sind. Als Säule wurde eine HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade-Säule verwendet, die mit dem ÄKTAprime™ plus-System betrieben wurde. Die genutzten Proteine zur Erstellung der Eichgeraden stammen aus dem Kit for Molecular Weights 12,000-200,000 (Tabelle 20, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die Chromatografie wurde mit einem Tris-Puffer (Tabelle 21) durchgeführt. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Der während der Chromatografie aufgebaute Druck betrug ca. 0,24 bar. Zum Auftragen der Proteine auf die Säule wurde ein Superloop™ (50 ml, GE Healthcare, Uppsala, SE) genutzt. Das Probenvolumen betrug 1 ml. Die Elutionsvolumina V_e der Standardproteine wurden notiert und zur Erstellung der Eichgeraden genutzt.

Tabelle 20: Proteine zur Eichung der Größenausschlussäule

Protein	Molmasse in Da	Log (Molmasse)
Blue Dextran (V_o)	2000000	6,30
β -Amylase, Süßkartoffel	200000	5,30
Alkoholdehydrogenase, Hefe	150000	5,18
BSA, Rind	66000	4,82
<i>carbonic anhydrase</i> , Erythrozyten	29000	4,46
Cytochrom c, Pferd	12000	4,08

Tabelle 21: Tris-Puffer zur Erstellung der Eichgeraden

Tris/HCl-Puffer	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	50 mM

4.2.6.18. Bestimmung der Molmasse von Proteinen mit Größenausschlusschromatografie

Zur Erfassung der Molekülgröße von Proteinen unbekannter Größe mit Größenausschlusschromatografie wurde die unter Punkt 4.2.6.17 geeichte Säule verwendet. Der genutzte Puffer, das FPLC-System sowie die angewandten Laufbedingungen waren identisch zu Punkt 4.2.6.17. Die Proteine, deren Molmassen bestimmt werden sollten, wurden vorgereinigt, in Tris-Puffer aufgenommen und auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Danach wurden die Proteine auf die Säule appliziert und V_e bestimmt.

4.2.7. Massenspektrometrische Untersuchungen

Zur Proteinidentifikation und Überprüfung der vollständigen Lipoylierung der verwendeten H-Proteine wurden massenspektrometrische Untersuchungen angefertigt. Diese wurden am Biomedizinischen Forschungszentrum Rostock (BMFZ) in der Abteilung „Core Facility Proteomanalytik“ von Dr. Stefan Mikkat durchgeführt. Hierzu wurden aus SDS-Gelen isolierte Proteine sowie gereinigte Proteine mit einem Reflex III Massenspektrometer untersucht (Bruker Daltonics, Bremen). Zur exakten Bestimmung der Proteinmasse wurden die Proteine mit einem Aliquot des Proteinstandards I (Bruker Daltonics, Bremen) gemischt. Dies ermöglichte eine interne Kalibrierung des Massenspektrometers und eine Bestimmung der Proteinmasse mit einem Fehler von ± 1 Da.

4.2.8. Enzymatische Ansätze

4.2.8.1. Proteolytische Abtrennung des N-terminalen Histidin-Tags von H-Proteinen durch Thrombin-Behandlung

Damit der Einfluss des N-terminalen Histidin-Tags auf die Substrateigenschaften ausgeschlossen werden konnte, wurde dieser durch eine Thrombin-Behandlung entfernt. Hierzu wurde lyophilisiertes Thrombin verwendet (Sigma Aldrich, Taufkirchen). Dieses wurde in Thrombin-Lagerpuffer (Tabelle 22) resuspendiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Konzentration des Enzyms betrug nach dem Lösen in Lagerpuffer 0,5 - 1 U/ml. Das zu behandelnde H-Protein wurde mit PD-10 Säulen in 1-fachem Thrombin-Reaktionspuffer (Tabelle 22) umgepuffert. Für die Reaktion wurde Thrombin in der Menge 1U/mg H-Protein beigemischt und für 16 h bei 20 °C inkubiert. Die vollständige Abspaltung des Histidin-Tags wurde in einer anschließend durchgeführten SDS-PAGE überprüft. Zur Entfernung der Histidin-Tags wurden die H-Proteine mit einer Größenausschlusschromatografie oder IMAC nachgereinigt.

Tabelle 22: Puffer zur Lagerung von lyophilisiertem Thrombin und dem enzymatischen Ansatz einer Thrombin-Spaltung

Thrombin-Lagerpuffer	Konzentration	10 x Reaktionspuffer	Konzentration
Natriumcitrat pH 6,8	50 mM	Tris/HCl pH 8,4	200 mM
NaCl	200 mM	NaCl	1,5 M
PEG 8000	1 mM	CaCl ₂	25 mM
Glycerol	50 %		

4.2.8.2. *In vitro* Lipoylierung von H-Proteinen mit LPL-A aus *E. coli*

Um als Substrat für die Glycin-Decarboxylierungsreaktion des P-Proteins dienen zu können, müssen die verwendeten H-Proteine lipoyliert werden. Hierzu wurde den *E. coli* Kulturen zunächst Lipoat zugeführt. Da der Wirtsorganismus selbst über Proteinkomplexe wie PDC und KDC sowie ein H-Protein verfügt, die nur nach Lipoylierung funktionstüchtig sind, ist *E. coli* selbst in der Lage Zielproteine mit einem Lipoamidarm zu modifizieren. Durch die hohe Expressionsrate der H-Proteine nach der Induktion der heterologen Genexpression wurden jedoch nicht alle heterolog exprimierten H-Proteine modifiziert. Deshalb wurde ein *in vitro* Ansatz erstellt, der eine vollständige Lipoylierung der H-Proteine ermöglicht. Hierzu wurde das modifizierende Enzym LPL-A aus *E. coli* exprimiert. Dieses Enzym kann unter Zusatz von ATP und Lipoat H-Proteine kovalent am Lysinrest modifizieren. Da die LPL-A ein oxidationsempfindliches Enzym ist, wurde der Reaktionspuffer (Tabelle 23) vor der Verwendung entgast.

Tabelle 23: Reaktionspuffer (100-fach) zur *in vitro* Lipoylierung von H-Proteinen

100 x Reaktionspuffer	Konzentration	1 x Reaktionspuffer	Konzentration
MOPS/ Tris pH 7	1 M	MOPS/ Tris pH 7	10 mM
MgCl ₂	0,5 M	MgCl ₂	5 mM
β-Mercaptoethanol	0,5 M	β-Mercaptoethanol	5 mM

Das zu lipoylierende H-Protein wurde anschließend in einen entgasten Puffer mit PD-10 Säulen überführt. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 24 beschrieben durchgeführt und für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Das Ansatzvolumen wurde so gewählt, dass eine H-Protein-Konzentration von 0,6 mg/ml erreicht wurde. Die vollständige Lipoylierung des H-Proteins wurde in einer nativen PAGE und einer massenspektrometrischen Untersuchung überprüft. Nach der Reaktion wurden die H-Proteine zur Entfernung der LPL-A aus der Proteinlösung nachgereinigt. Hierzu wurden ein Ionenaustausch mit Q-SepharoseTM und eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt.

Tabelle 24: Beispiel eines *in vitro* Lipoylierungsansatzes mit 20 mg H-Protein

Ansatz (0,6 mg/ml H-Protein → Endvolumen 33 ml)	Menge	Konzentration
100 x Reaktionspuffer	0,33 ml	10 mM
H-Protein (umgepuffert mit PD-10 in 1 x Reaktionspuffer)	3,5 ml	0,6 mg/ml
ATP-Lösung	1,65 ml	5 mM
Lipoatligase-A (aus <i>E. coli</i>)	0,277 ml	0,8 µM
(±)-α-lipoic-acid (0,24 M Stammlösung in Ethanol)	0,051 ml	400 µM
H ₂ O	ad. 33 ml	-----

4.2.8.3. Aktivitätsbestimmung des *Synechocystis* P-Proteins

Das P-Protein ist die GCS-Untereinheit, die Glycin decarboxylieren kann. Hierfür muss das P-Protein als Holoprotein vorliegen, das heißt, im aktiven Zentrum muss ein PLP gebunden sein. Die Substrate für diese Reaktion sind Glycin und das H-Protein, welches als Aminomethylen-Akzeptor fungiert. In dieser Dissertation wurde die P-Protein-Aktivität *in vitro* über den sogenannten Bicarbonat-Austausch gemessen, der unter oxidativen Bedingungen stattfinden kann. Der Bicarbonat-Austausch als gemessene Aktivität der Glycin-Decarboxylase wurde erstmals 1966 am Beispiel des P-Proteins aus *Peptococcus glycinophilus* beschrieben (Klein & Sagers, 1966a). Der schematische Ablauf der Reaktion ist in Abb. 9 dargestellt.

Beim Bicarbonat-Austausch handelt es sich um eine Reaktion, in der Glycin decarboxyliert und anschließend wieder synthetisiert wird. Auf diese Weise kann radioaktiv-markiertes ¹⁴CO₂ in Glycin eingebaut werden. Die Menge des synthetisierten Glycins wird anschließend mit einem Szintillationszähler gemessen. In Tabelle 25 ist ein exemplarischer Enzymansatz zur Messung der P-Protein-Aktivität wiedergegeben. Die Konzentrationen der P-Protein-Substrate wurden zur Ermittlung der biochemischen Parameter variiert. Die Ansätze wurden mit Ausnahme des radioaktiv-markierten

Bicarbonats auf Eis pipettiert und anschließend im Isotopenlabor für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

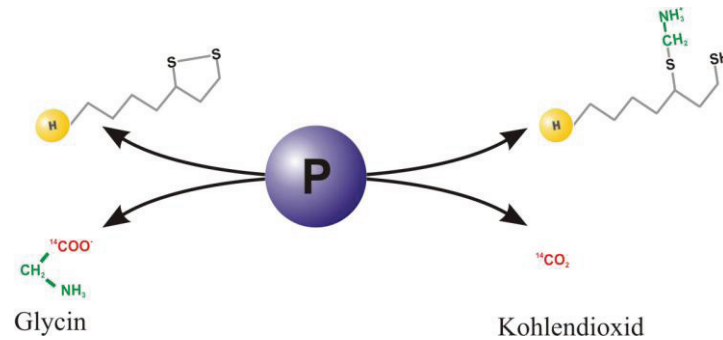


Abb. 9: Schematischer Ablauf des Bicarbonat-Austauschs.

Die Reaktion wurde durch Bicarbonat-Zugabe gestartet und in einem temperierten Heizblock bei 30 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 80 µl 50%ige Trichloressigsäure in Szintillationsvials (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl des Ansatzes in die Szintillationsvials mit Trichloressigsäure abgestoppt. Die Vials wurden anschließend über Nacht auf eine Heizplatte gestellt (80 °C), um das restliche Kohlendioxid durch Eindampfung zu entfernen.

Tabelle 25: Ansatz zur Messung der P-Protein-Aktivität

Ansatz (Volumen 300 µl, 2,5 µg P-Protein)	Menge	Konzentration
Na-Phosphat pH 6 (1 M)	30 µl	100 mM
PLP-Lösung (1 mM, in H ₂ O)	30 µl	100 µM
DTT-Lösung (10 mM, in H ₂ O)	30 µl	1 mM
Glycin (200 mM)	x µl	-----
H-Protein	x µl	-----
P-Protein (2,5 µg P-Protein)	x µl	0,04 µM
H ₂ O	ad. 270 µl	-----
Bicarbonat (¹⁴ C, 300 mM, 2,5 µCi)	30 µl	30 mM

Am nächsten Tag wurden die Vials mit 500 µl H₂O befüllt und geschüttelt, um das säurestabile Glycin zu lösen. Nach der Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit wurden die Ansätze mit einem Szintillationszähler (Tricarb 2100 TR Scintillation Analyzer, PerkinElmer, Waltham, USA) vermessen.

4.2.8.4. Dampfdiffusionsmethode

Die Dampfdiffusionsmethode ist eine effektive Technik zur Synthese von makromolekularen Kristallen. Hierbei wird eine Proteinlösung mit einer Reservoirlösung vermengt, die dadurch verdünnt wird. Dieser Ansatz mit einem kleinen Volumen (1-10 μl) steht in einem abgeschlossenen System über Dampfdruck mit einem großen Reservoir des unverdünnten Fällungsmittels in Verbindung (1 ml). Die hygroskopische Äquilibration des Systems, d. h. das Erreichen des Zustands, in dem kein weiterer Nettoaustausch über die Gasphase stattfindet, vollzieht sich in der Regel innerhalb von 24-48 h. Während der Äquilibration erhöhen sich die Protein- und Salzkonzentrationen im Ansatz und die Proteinlösung geht in die Nukleationsphase über (Abb. 10, rechts). Nachdem sich die Kristallisationskeime (Nuklei) gebildet haben verringert sich die Proteinkonzentration im Ansatz und die Proteinlösung geht in die Kristallwachstumsphase über. Diese Ansätze können als sogenannter *hanging-* oder *sitting-drop* angesetzt werden (Abb. 10).

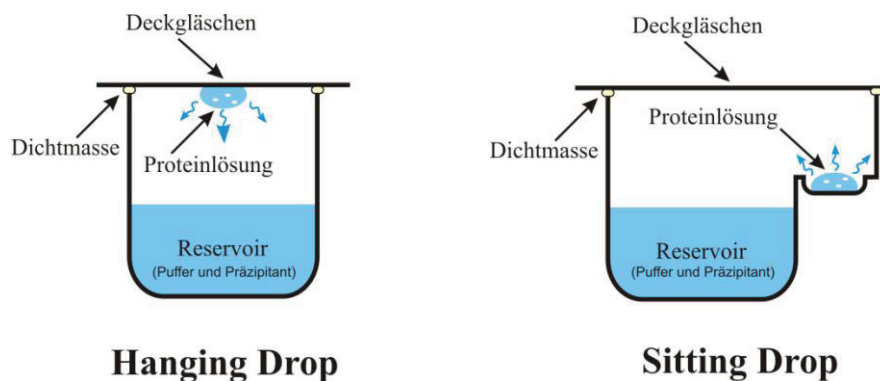


Abb. 10: Schematische Darstellung des *hanging-* und *sitting-drop*-Dampfdiffusionsverfahrens. Eine Proteinlösung wird mit einer Reservoirlösung vermengt und in einem geschlossenen Gefäß über der im Überschuss vorhandenen Reservoirlösung platziert. Innerhalb von 1-2 Tagen stellt sich ein Äquilibrium ein. Dabei wird dem Proteintropfen Wasser entzogen, wodurch die Protein und Salzkonzentration im Proteintropfen steigen.

4.2.8.5. Screening nach geeigneten Kristallisationsbedingungen

Verschiedene Proteine zeigen in Lösung unterschiedliche Eigenschaften. Es ist deshalb unmöglich, das Phasendiagramm eines spezifischen Proteins vorherzusagen. Deshalb ist das Finden geeigneter Kristallisationsbedingungen ein Prozess, der nach dem Prinzip „Versuch und Irrtum“ durchgeführt wird. Zahlreiche verschiedene Kristallisationsbedingungen, die für eine Vielzahl von Proteinen zur Kristallbildung führten, sind in sogenannten *crystal screens* zusammen gefasst. Diese sind kommerziell erhältlich und bieten eine einfache Möglichkeit, zahlreiche Kristallisationsbedingungen zu testen. Außerdem wurden parallel mehrere identische Ansätze angefertigt, um die Kristallisation der Proteine bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen (4 °C, 16 °C, 20 °C). Die Ansätze wurden als *sitting-drop*-Experimente in 96-WellPlatten mit 80 μl der *crystal screen*-Reservoir-Lösungen durchgeführt. Anschließend wurde 1 μl Proteinlösung mit 1 μl Reservoirlösung gemischt und in die Vertiefung über die jeweilige Reservoirlösung pipettiert. Nach dem Ansatz einer

vollständigen Platte wurde diese von oben mit VIEWseal™-Klebefolie (Greiner, Frickenhausen) verschlossen.

4.2.8.6. *Grid screen* für die Verbesserung der Kristallqualität

Nachdem vielversprechende Kristallisationsbedingungen gefunden wurden, mussten *grid screens* zur Verbesserung der Kristallqualität durchgeführt werden. In diesen werden zwei Versuchsparameter verändert, während die anderen konstant bleiben. Auf diese Weise nähert man sich den idealen Kristallisationsbedingungen an.

Grid screens wurden mit dem „24-well EasyXtal Crystallization Tool“ (Qiagen, Hilden) angesetzt. Sie sind für den Ansatz von *hanging-drop*-Experimenten konzipiert. Für einen Kristallisationsansatz wurde 1 ml Reservoirlösung in das Well gegeben. Anschließend wurden 2 µl Proteinlösung mit 2 µl Reservoirlösung vermischt, danach auf ein Deckgläschen pipettiert und der Ansatz inkubiert.

4.2.8.7. P-Protein-Kristalle durch *streak seeding*

Die als *streak seeding* bezeichnete Methode ermöglicht die Kristallisation von Proteinen, ohne dass die Nukleationsphase (Abb. 44) erreicht wird (D'Arcy *et al.*, 2004). Durch die schlechte Reproduzierbarkeit der P-Protein-Kristallisierung wurde dieses Verfahren eingesetzt, um P-Protein-Kristalle zu vervielfältigen. Bei dieser Methode wurde ein Kristall mithilfe eines *loops* in eine frische Reservoirlösung überführt und mit einer Nadel oder Glaskapillare zerkleinert. Das Beimpfen des Tropfens erfolgte mit einem dicken Haar (z. B. Katzenschnurrhaar), welches in die Mikrokristalllösung getaucht wird (Abb. 11, 1). Auf diese Weise bleiben mikroskopisch kleine Kristallpartikel an der Oberfläche des Haars haften. Das Haar wird anschließend mittig durch einen neuen Kristallisationstropfen gezogen (Abb. 11, 2). Dabei werden einige der am Haar haftenden Mikrokristalle im Tropfen abgelegt. Diese dienen als Nukleationskern für das Wachstum neuer Kristalle (Abb. 11, 3).

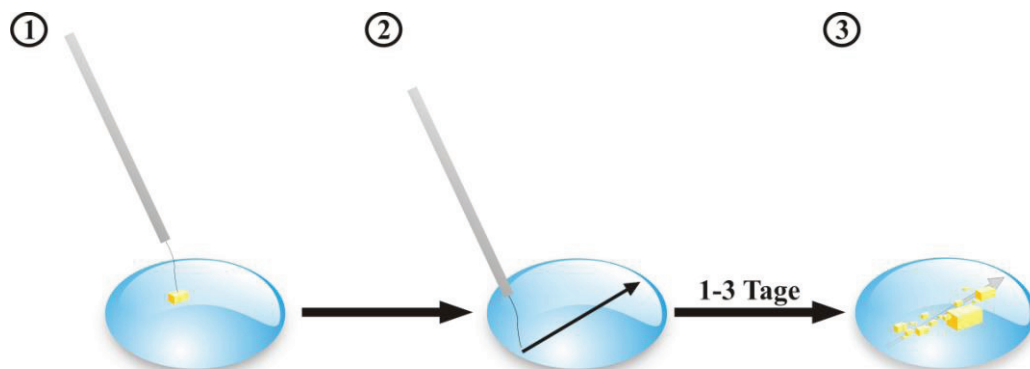


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung zur Durchführung von *streak seeding*. 1: Mikrokristalle werden mithilfe eines Haars von einem Kristall entfernt. 2: Das Haar mit den Mikrokristallen wird durch einen frisch angesetzten Kristallisationstropfen gezogen. 3: Entlang der Linie, in der das Haar den Tropfen durchlief, wachsen neue Kristalle heran.

4.2.8.8. Aufnahmen kristallografischer Datensätze mit Synchrotronstrahlung

Die Vermessung der Proteinkristalle wurde an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Beamline ID 14-1 und ID 14-4) in Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Die dort zu Verfügung gestellte Synchrotronstrahlung wird durch in einem magnetischen Feld abgelenkte Elektronen erzeugt, welche sich nahezu mit Lichtgeschwindigkeit bewegen. Die erzeugten Röntgenstrahlen sind hochparallel, monochromatisch und stark fokussiert. Die Energie der Strahlung ist um ein bis zwei Größenordnungen höher als die eines Drehanodengenerators. Dies ermöglicht die Aufnahme eines kompletten Datensatzes in nur wenigen Minuten. Die genauen Messparameter und Detektionsverfahren sind im Ergebnisteil unter den einzelnen Experimenten beschrieben.

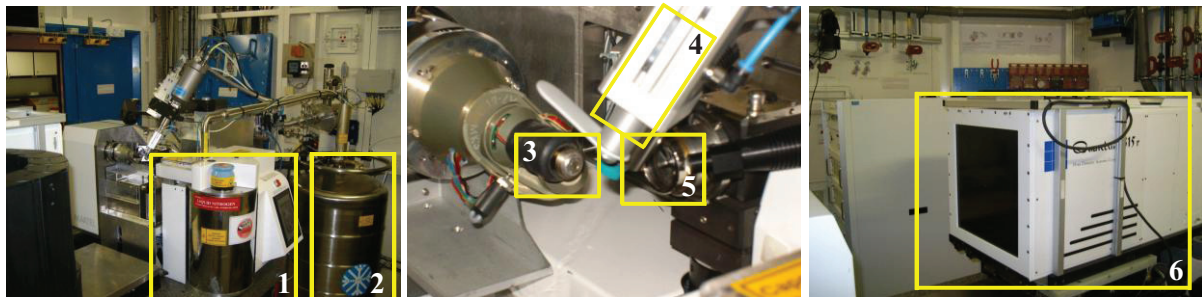


Abb. 12: Messaufbau und Geräte für röntgenkristallografische Analysen. Dargestellt sind die Apparaturen in der Beamline ID14-4 (ESRF, Grenoble). Dieser Aufbau entspricht im Wesentlichen auch dem Aufbau einer Drehanodengenerator-Apparatur. Bevor die Proben vermessen werden, befinden diese sich im *sample changer* (1). Dieser wird automatisch mit flüssigem Stickstoff aus einem Versorgungstank (2) gekühlt. Die Röntgenstrahlung tritt in Punkt 5 aus, wird durch den Collimator geleitet (nicht zu sehen) und trifft anschließend auf den Kristall, der auf dem Goniometerkopf (3) befestigt ist. Der Goniometerkopf lässt sich über eine Fernsteuerung justieren und ermöglicht eine Zentrierung des Kristalls im Röntgenstrahl. Durch den laminaren Stickstoffstrom (4) beträgt die Temperatur des Kristalls während der Messung 100 K. Die am Proteinkristall gebeugten Röntgenstrahlen werden an einem CCD-Detektor (6) aufgezeichnet.

4.2.8.9. *In silico* Auswertung der Beugungsdaten

Die am ESRF in Grenoble erzeugten Daten wurden von Frau Prof. Inger Andersson und Frau Dr. Evalena Andersson in Uppsala (Schweden) ausgewertet. Die zur Erstellung des P-Apoproteinmodells verwendeten Daten stammen vom Datensatz des Apoprotein-Kristalls 33. Die Struktur wurde gelöst durch *molecular replacement*. Als Suchmolekül diente das Modell des P-Proteins aus *T. thermophilus* (pdb: 1wyt). Die zur Strukturaufklärung und Verfeinerung des Modells verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26: Computerprogramme zur Strukturaufklärung und Verfeinerung des P-Protein-Modells

Programm	Verwendung	Referenz
Phaser	Strukturaufklärung durch <i>molecular replacement</i>	(McCoy <i>et al.</i> , 2007)
ARP/wARP	Automatische Erstellung eines ersten Proteinmodells	(Perrakis <i>et al.</i> , 1999)
Refmac5	<i>structure refinement</i>	(Murshudov <i>et al.</i> , 1997)
CCP4	Programmpaket, welches die Programme Phaser, ARP/wARP und Refmac5 beinhaltet	(Collaborative, 1994)
Phenix	<i>structure refinement, simulated annealing</i>	(Adams <i>et al.</i> , 2002)
O	<i>model inspection and model building</i>	(Jones <i>et al.</i> , 1991)

5. Ergebnisse

5.1. Reinigung und Modifikation heterolog exprimierter Proteine

5.1.1. Reinigung pro- und eukaryotischer GCS-Proteine für enzymatische Messungen

Zur biochemischen Charakterisierung des *Synechocystis* P-Proteins wurde dessen enzymatische Aktivität mit prokaryotischen und eukaryotischen H-Proteinen als Substrat vermessen. Hierzu wurden die entsprechenden Gene in Expressionsvektoren kloniert und anschließend über den N-terminal fusionierten His-Tag mittels IMAC aus einem Proteinrohextrakt gereinigt. Die Gene der eukaryotischen H-Proteine wurden ohne die DNA-Sequenz für das mitochondriale Targetprotein in die pET-Expressionsvektoren eingebaut. Wie in der Abb. 13 dokumentiert, wurden das P- und die H-Proteine ohne Verunreinigungen erhalten.

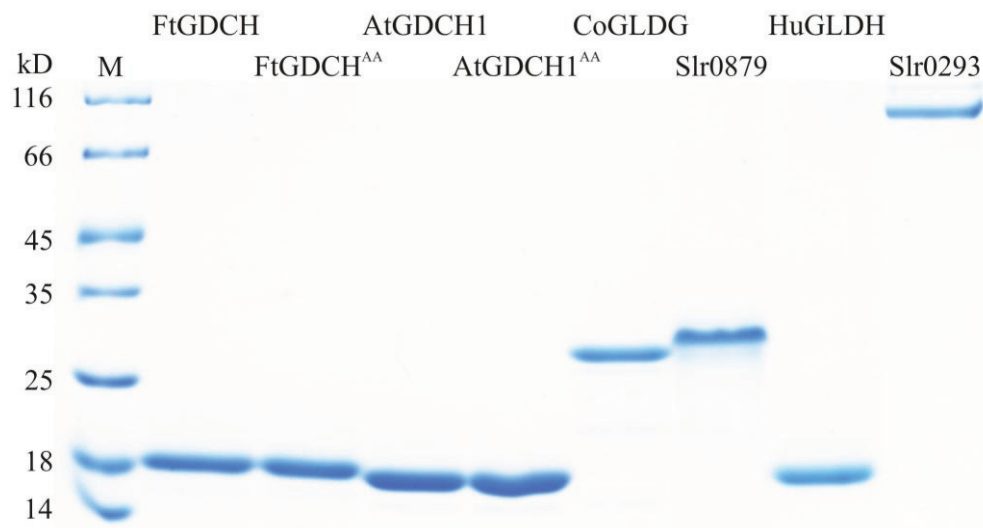


Abb. 13: SDS-PAGE zur Kontrolle der Reinigung des *Synechocystis* P-Proteins und pro- und eukaryotischen H-Proteinen. (Proteinerklärungen siehe Tabelle 27)

Die durchgeführte Glycin-SDS-PAGE zeigte, dass die H-Proteine teilweise abweichend von ihren theoretisch zu erwartenden Größen liefen. Während das Laufverhalten der eukaryotischen H-Proteine nur leicht abwich, zeigten die bakteriellen H-Proteine trotz ähnlicher Molekularmassen ein deutlich verändertes Migrationsverhalten im Acrylamidgel. Die H-Proteine aus *E. coli* und *Synechocystis* liefen bei einer Molekularmasse von ca. 30 kD, während das H-Protein aus *T. elongatus* viel kleiner als die theoretische Molmasse erschien (nicht gezeigt). Das Monomer des homodimeren cyanobakteriellen P-Proteins aus *Synechocystis* wurde bei der erwarteten Größe von ca. 110 kD detektiert.

Tabelle 27: Liste der in Abb. 13 aufgetrennten Proteine. Die angegebenen *acc. nr.* entstammen der NCBI-Datenbank. Das H-Protein AtGLDH1^{AA} besitzt keine *acc. nr.*, da es sich um eine mutierte Variante des H-Proteins AtGLDH1 handelt, die während dieser Dissertationsarbeit hergestellt wurde. Die Spalte „Aminosäuren“ gibt an, welche AS-Reste der vollständigen Sequenz in die Expressionsvektoren kloniert wurden. Die Größe in Da ist die Molekularmasse der Proteine inklusive His-Tag.

H-Protein	Organismus	<i>acc. nr.</i>	Aminosäuren	Größe in Da (Monomer)
FtGLDH	<i>F. trinervia</i>	CAA88734	32-163	16335,1
FtGLDH ^{AA}	<i>F. trinervia</i>	P46485	32-165	16477,3
AtGLDH1	<i>A. thaliana</i>	NP_181080	35-165	16523,4
AtGLDH1 ^{AA}	<i>A. thaliana</i>	-----	35-167	16665,5
CoGLDH	<i>E. coli</i>	NP_289472	2-129	16145,7
Slr0879	<i>Synechocystis</i>	NP_440920	1-132	16743,2
HuGLDH	<i>H. sapiens</i>	NP_004474	59-147	16266,0
Tlr1476	<i>T. elongatus</i>	BAC09230	13-139	15690,4
Slr0293	<i>Synechocystis</i>	NP_441838	1-983	111723,9

5.1.1.1. Abspaltung des N-terminalen Histidin-Tags mittels Thrombin-Spaltung

H-Proteine dienen als P-Protein-Substrat und sind sowohl Aminomethylen- als auch Elektronenüberträger. Aufgrund ihrer geringen Molekülmasse bestand die Möglichkeit, dass die Fusion mit dem N-terminalen His-Tag zu einer Beeinträchtigung der H-Protein-Funktion führen könnte. Aufgrund dessen wurde ein Protokoll erarbeitet, das eine *in vitro*-Abspaltung des fusionierten Peptids erlaubt. Im pET28a-Expressionsvektor ist kurz nach der Hexahistidin-Sequenz eine Thrombin-Schnittstelle kodiert, sodass eine proteolytische Abtrennung des His-Tags möglich ist. Mit Thrombin wurden die pflanzlichen H-Fusionsproteine FtGLDH, AtGLDH1 sowie das H-Protein HuGLDH und das *Synechocystis* H-Protein Slr0879 behandelt. Die unterschiedlichen Laufeigenschaften der Fusionsproteine (His) und Thrombin-Spaltprodukte (w/o) sind deutlich in der SDS-PAGE erkennbar (Abb. 14). Das ungewöhnliche Laufverhalten des *Synechocystis* H-Proteins (vgl. Abb. 13) bei einer Molmasse von ca. 30 kD wurde auch hier beobachtet. Die Abtrennung des His-Tags führte zwar zu einer Verkleinerung des H-Proteins im Vergleich zum Fusionsprotein, jedoch spricht auch hier die Migration im Acrylamidgel eher für die Bildung stabiler H-Protein-Dimeren. Der His-Tag kann deshalb nicht für das ungewöhnliche Laufverhalten des *Synechocystis* H-Proteins verantwortlich sein.

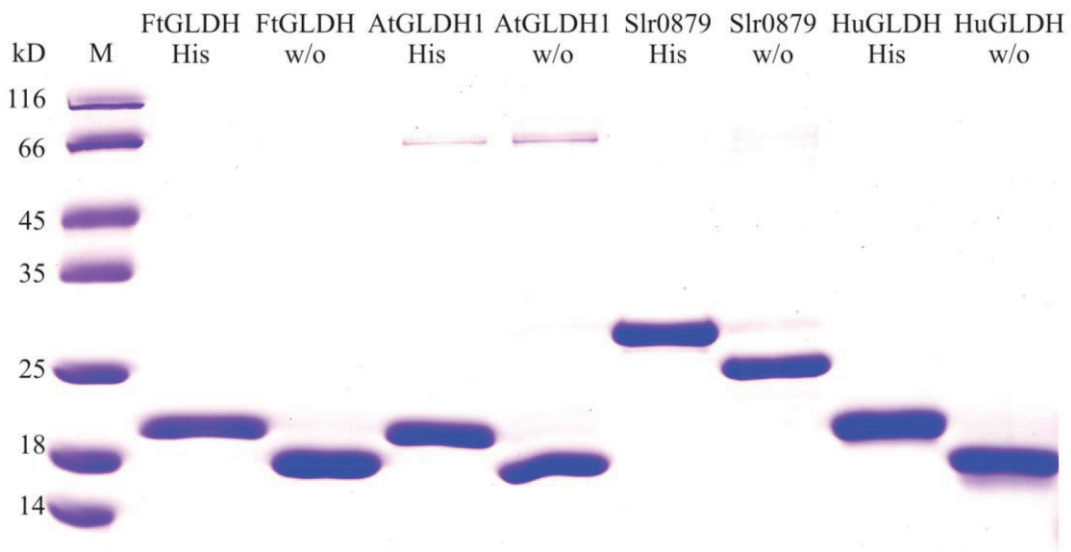


Abb. 14: SDS-PAGE nach einem Thrombin-Spaltungsexperiment mit pro- und eukaryotischen H-Proteinen. Nebeneinander aufgetragen wurden die pflanzlichen H-Proteine FtGLDH (*F. trinervia*) und AtGLDH1 (*A. thaliana*) sowie das H-Protein HuGLDH aus *H. sapiens* und das *Synechocystis* H-Protein Slr0879 mit Histidin-Tag (His) bzw. die Thrombin-Spaltprodukte (w/o).

Eine Abtrennung des His-Tags am *E. coli* H-Protein war nicht möglich, da der hier verwendete Expressionsvektor über keine Proteaseschnittstelle verfügte. Die Thrombin-Spaltung des H-Fusionsproteins Tlr1476 führte dazu, dass das Spaltprodukt in einem 12,5%igen Acrylamidgel mit der Bromphenolblau-Lauffront mitlief (nicht gezeigt). Das Ergebnis in Abb. 14 dokumentiert, dass alle N-terminalen Hexahistidin-Sequenzen der pET28a-exprimierten H-Proteine sterisch für die Spaltung mit Thrombin zugänglich waren und entfernt werden konnten. Die hierdurch gewonnenen Proteine verfügten zwar nicht mehr über einen vollständigen His-Tag, jedoch blieb eine vier Aminosäuren lange Sequenz als N-terminale Extension erhalten (Gly-Ser-His-Met).

5.1.1.2. Expression und Reinigung von pflanzlichen H-Proteinen ohne Affinitätstag

Die H-Proteine FtGLDH und FtGLDH^{AA} aus *F. trinervia* entstehen durch alternatives Spleißen aus einer prä-mRNA (Kopriva *et al.*, 1995), die sich durch den Einschub von zwei zusätzlichen Alanin-Molekülen nach den ersten beiden Aminosäuren des N-Terminus beim Protein FtGLDH^{AA} unterscheiden. Um einen biochemischen Effekt dieser Insertion auf die P-Protein-Aktivität zu verifizieren, wurde zusätzlich zu FtGLDH^{AA} das H-Protein AtGLDH1 aus *Arabidopsis* mutiert, indem ebenfalls zwei Alanin-Moleküle nach den ersten beiden Aminosäuren des reifen Proteins inseriert wurden (Herstellung siehe Hasse *et al.*, 2009). Zur Expression dieser pflanzlichen H-Proteine eignete sich das Plasmid pET28a nur bedingt, da selbst nach der Abtrennung des N-terminalen His-Tags durch Thrombin noch 4 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus erhalten blieben. Für eine stichhaltige Bestätigung des

Einflusses der Alanin-Molekülinsertion in FtGLDH^{AA} und der Mutante AtGLDH^{AA} war jedoch eine Entfernung der restlichen 4 AS erforderlich, da nur auf diesem Weg die heterolog exprimierten Proteine identisch zu den nativen pflanzlichen H-Proteinen waren. Deshalb wurden diese H-Proteine zusätzlich in das Expressionssystem pET3a kloniert, um rekombinante Proteine ohne Affinitätstag zu gewinnen.

Tabelle 28: Isoelektrische Punkte und Molekularmassen der verwendeten pflanzlichen H-Proteine ohne Transitpeptidsequenz

H-Protein	isoelektrischer Punkt	native Molekularmasse in Da
FtGLDH	4,91	14040,6
FtGLDH ^{AA}	4,91	14182,8
AtGLDH1	4,73	14228,8
AtGLDH1 ^{AA}	4,73	14371,0

Native H-Proteine besitzen zwei Eigenschaften, die ihre Reinigung erleichtern. Durch die relativ hohe Anzahl an sauren Aminosäuren haben H-Proteine eine relativ starke negative Nettoladung und andererseits sind sie mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 15 kD relativ klein. Daher lassen native H-Proteine ohne größeren Aufwand aus einem Proteinrohextrakt aufreinigen (Tabelle 28). Hierzu wurden die in pET3a klonierten H-Proteine in *E. coli* exprimiert und anschließend an eine Q-Sepharose-Matrix gebunden. Durch den niedrigen isoelektrischen Punkt der H-Proteine binden diese bei pH 6, während ein großer Teil der Proteine im Rohextrakt durch die Säule laufen. Die Elution erfolgte anschließend mit einem linearen Salzgradienten (Abb. 15).

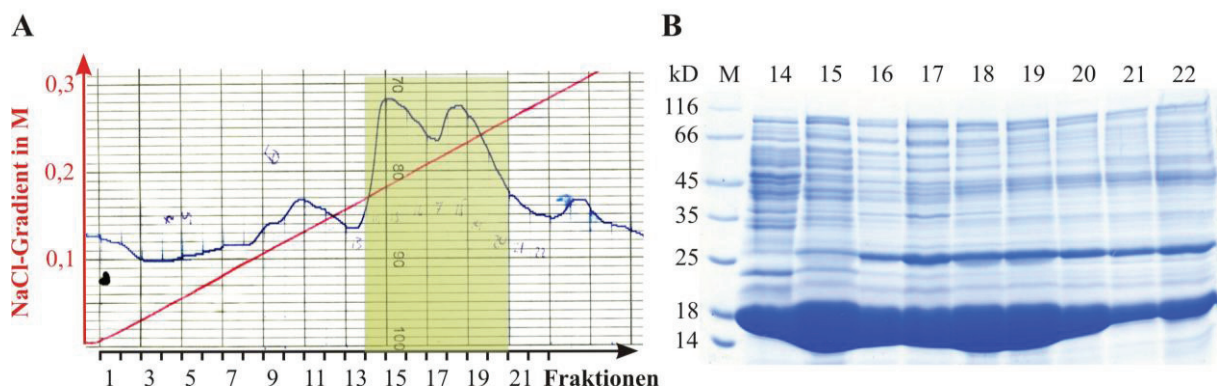


Abb. 15: (A) Reinigung von FtGLDH durch Ionenaustauschchromatografie mit Q-Sepharose aus einem *E. coli* Proteinrohextrakt. (B) SDS-PAGE der erhaltenen Fraktionen. Das H-Protein wurde über einen linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die Fraktionen, welche FtGLDH enthalten (A, grün), wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Das H-Protein FtGLDH wurde von der Q-Sepharose-Matrix in den Fraktionen 14-20 bei einer NaCl-Konzentration von ca. 160-240 mM in zwei Peaks eluiert (Abb. 15A). Dieses Ergebnis deutete auf eine unvollständige Lipoylierung des heterolog exprimierten H-Proteins hin. Durch die kovalente Modifikation des konservierten Lysinrests mit Liponsäure wird das H-Holoprotein elektronegativer und bindet stärker an die Q-Sepharose, sodass eine verzögerte Elution von der Austauschersäule gegenüber dem nicht-modifizierten H-Protein erfolgt. Die zwei Formen des H-Apo- und Holoproteins waren ebenfalls in der anschließend durchgeführten SDS-PAGE erkennbar (Abb. 15B).

Zur Absicherung der vollständigen Lipoylierung des H-Proteins wurde den *E. coli*-Kulturen während der Expression Liponsäure zugeführt. Diese wird während der Kultivierung direkt über die Zellmembran aufgenommen und mithilfe der LPL-A auf entsprechende Zielproteine übertragen (Morris *et al.*, 1995). Trotzdem wurde nur etwa die Hälfte des produzierten Proteins kovalent mit Liponsäure modifiziert (Abb. 15). Die nicht vollständig modifizierten H-Proteine eigneten sich nicht für biochemische Analysen. Es wurde deshalb ein Protokoll etabliert, mit dem im Anschluss an die Reinigung eine *in vitro* Lipoylierung der H-Proteine durchgeführt werden konnte (4.2.8.2).

Zur weiteren Reinigung wurden die H-Protein-Fractionen vereinigt und eine Größenausschlusschromatografie (HiPrep™ Sephacryl™ S-100 Säule) durchgeführt. Durch die geringe Größe der H-Proteine wurden nach diesem Schritt Fraktionen erhalten, die nur noch einen sehr geringen Anteil an Fremdproteinen enthielten (Abb. 16). Diese Fraktionen wurden erneut vereinigt und für die nachfolgende *in vitro* Lipoylierung verwendet.

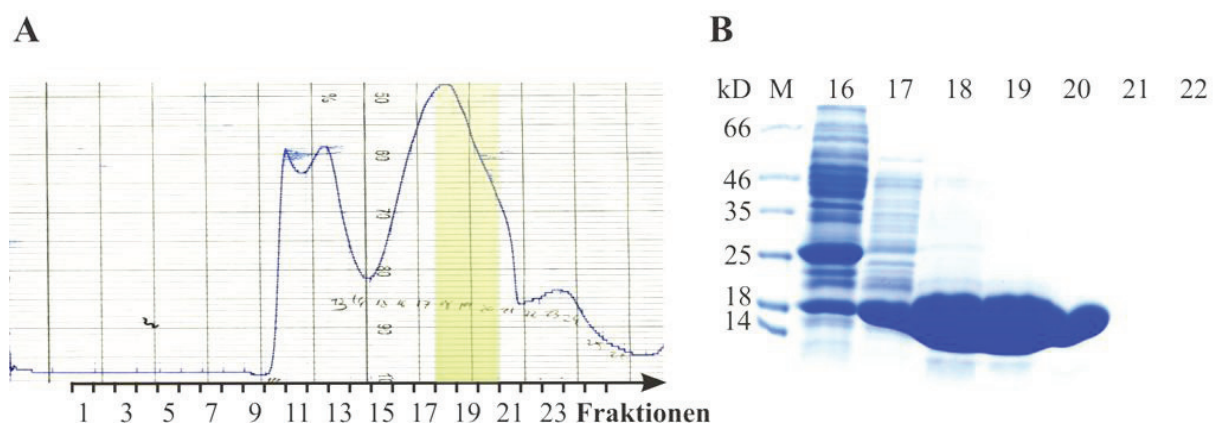


Abb. 16: (A) Reinigung von FtGLDH durch Größenausschlusschromatografie mit HiPrep™ Sephacryl™ S-1. (B) SDS-PAGE der erhaltenen Fraktionen. Die Proteinfractionen 16-22 wurden mit einer SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen 18-20 (grün) wurden vereinigt und für die anschließenden Experimente verwendet.

Die Ergebnisse in der Abb. 15 und Abb. 16 zeigen anhand der exemplarischen Reinigung von FtGLDH, dass es durch nur zwei Reinigungsschritte möglich war, heterolog exprimierte pflanzliche H-Proteine ohne Affinitätstag mit einem hohen Reinheitsgrad aus einem bakteriellen Rohextrakt zu gewinnen. Alle in Tabelle 28 aufgeführten pflanzlichen H-Proteine

wurden auf diese Weise gereinigt. Selbst bei der Kontrolle von größeren Proteinmengen (4 μ g, Abb. 17) in einem Acrylamidgel waren keine Fremdproteinbanden erkennbar.

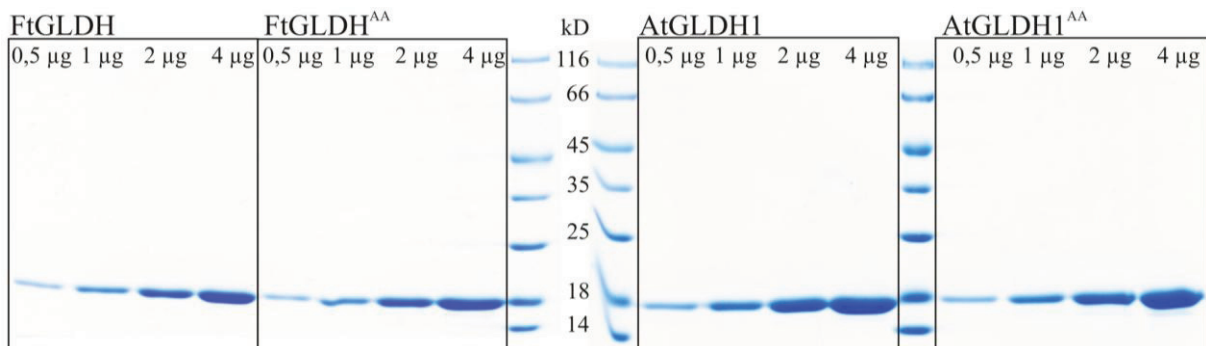


Abb. 17: SDS-PAGE zur Überprüfung von pflanzlichen H-Proteinen ohne Affinitätstag nach der Reinigung aus einem bakteriellen Rohextrakt. Aufgetragen wurden verschiedene Mengen (0,5-4 μ g) der H-Protein-Isolate.

5.1.1.3. *In vitro* Lipoylierung von H-Proteinen

Als zentraler GCS-Bestandteil (Abb. 3) wird das H-Protein an einem hochkonservierten Lysinrest kovalent über eine Amidbindung mit Liponsäure verbunden (Freudenberg & Andreessen, 1989, Kopriva *et al.*, 1996, Pares *et al.*, 1995). Nur mit Liponsäure modifizierte H-Proteine nehmen an der Reaktion des Bicarbonat-Austausches teil. H-Proteine ohne Modifikation treten mit den lipoylierten Proteinen in kompetitive Konkurrenz und verfälschen dadurch die gemessenen biochemischen Parameter (Neuburger *et al.*, 2000). Insbesondere wenn nur geringe Aktivitätsunterschiede, wie beim Vergleich der pflanzlichen H-Protein-Spleißvarianten (FtGLDH und FtGLDH^{AA}, AtGLDH1 und AtGLDH1^{AA}) zu erwarten sind, müssen die rekombinanten H-Proteine vollständig lipoyliert vorliegen. Die erste Möglichkeit zur Erzeugung von lipoyliertem H-Protein war die Zugabe von Liponsäure zu den Expressionskulturen. Durch die hohe Expression der Fremdgene unter Kontrolle des T7-Promotors wurden jedoch nicht alle Zielproteine lipoyliert (Abb. 15). Das *E. coli* eigene Lipoylierungssystem war demnach nicht in der Lage, die heterolog exprimierten Zielproteine vollständig zu modifizieren (Miles & Guest, 1987). Daher wurde empfohlen, durch eine Zugabe von Chloramphenicol die Proteinsynthese zu verlangsamen und die Modifikationsrate des H-Proteins zu erhöhen (Macherel *et al.*, 1996). Diese Methode führte hier jedoch nicht zu dem gewünschten Erfolg (nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurden alle verwendeten H-Proteine nach der Reinigung durch ein *in vitro* Verfahren vollständig lipoyliert. Man unterscheidet zwei Wege der Lipoylierung, den endogenen und den exogenen Weg. Beim endogenen Weg wird die in der Fettsäuresynthese gebildete Octansäure an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebunden. Diese wird durch das Enzym LipA (Lipoat Synthase) sulfuniliert und damit in Liponsäure umgewandelt (Miller *et al.*, 2000, Yasuno & Wada, 2002). Anschließend wird die gebildete Liponsäure durch das

Enzym LipB (Lipoyl-ACP: Protein *N*-Lipoyl-Transferase) kovalent auf das Apoprotein übertragen (Jordan & Cronan, 2003). Beim exogenen Weg wird das durch die Zellmembran aufgenommene Lipoat durch die LPL-A unter ATP-Verbrauch direkt auf das Zielprotein übertragen (Morris *et al.*, 1995). Für *E. coli* wurden sowohl die Gene *lipA* und *lipB* als auch das Gen *lplA* beschrieben (Morris *et al.*, 1995, Reed & Cronan, 1993).

5.1.1.3.1. Expression der *E. coli* Lipoat-Protein-Ligase-A (LPL-A)

Für *in vitro* Lipoylierungen von Zielproteinen eignet sich die Verwendung der LPL-A aus *E. coli*. Dieses Enzym kann Liponsäure unter Verbrauch von ATP auf den konservierten Lysinrest der H-Apoproteine übertragen (Morris *et al.*, 1995). Die LPL-A aus *E. coli* wurde in der Vergangenheit bereits zur *in vitro* Lipoylierung von Zielproteinen verwendet und sollte sich deshalb gut für die Modifikation exprimierter H-Proteine eignen (Gueguen *et al.*, 1999).

Zur heterologen Expression wurde das *lplA*-Gen aus *E. coli* in den Vektor pET28a kloniert. Durch die Verwendung der *Nde*I-Schnittstelle wurde die LPL-A mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert, der eine Reinigung des rekombinanten Proteins mit IMAC ermöglichte. Die Waschbedingungen während der Reinigung konnten durch die starke Bindung des Proteins an die Ni^{2+} -Sephrose so stringent gehalten werden, dass die LPL-A bereits nach diesem Reinigungsschritt sauber als 44 kD Fusionsprotein isoliert wurde (Abb. 18). Da das Enzym sehr oxidationsempfindlich ist (Green *et al.*, 1995), wurde allen Reinigungspuffern 15 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt.

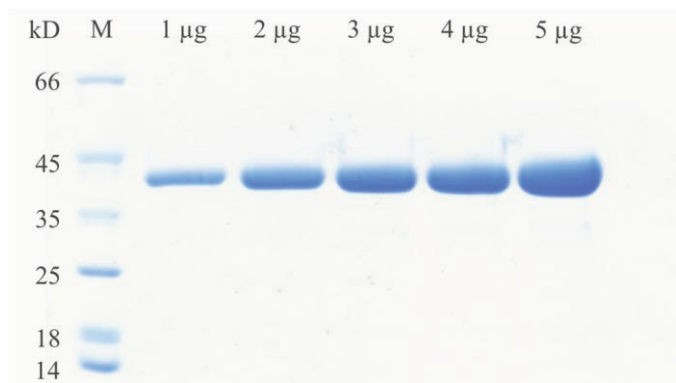


Abb. 18: SDS-PAGE zur Kontrolle der Reinheit der LPL-A. Die LPL-A aus *E. coli* wurde mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert und mit IMAC gereinigt. Aufgetrennt wurden verschiedene Mengen (1-5 μg) des gereinigten Proteins.

5.1.1.3.2. Lipoylierung des H-Proteins FtGLDH

Die isolierte LPL-A aus *E. coli* wurde anschließend zur Lipoylierung von H-Proteinen verwendet. Zur Veranschaulichung eines *in vitro* Lipoylierungsexperiments eignen sich die H-Proteine FtGLDH und FtGLDH^{AA}. Hier waren die Apo- und Holoproteine durch die

modifikationsbedingte Ladungsdifferenz in einer nativen PAGE klar voneinander differenzierbar (Abb. 19). Zu Beginn des Versuchs wurde die schon beobachtete 50:50-Verteilung der H-Apo- und Holoproteine dokumentiert (vgl. Abb. 15). Im weiteren Verlauf des Versuchs wurde durch die LPL-A immer mehr H-Apoprotein modifiziert, was durch die schwächer werdenden Apoprotein-Banden bei gleichzeitiger Zunahme der Holoprotein-Banden sichtbar wurde. Eine halbe Stunde nach dem Start der Reaktion befand sich ausschließlich lipoyliertes H-Protein im Ansatz.

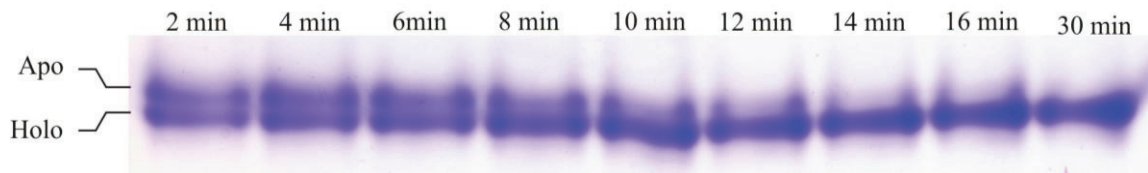


Abb. 19: Native-PAGE zur Überprüfung der *in vitro* Lipoylierung des H-Proteins FtGLDH. Einem Lipoylierungsansatz mit der LPL-A aus *E. coli* und dem H-Protein FtGLDH wurden in verschiedenen Zeitabständen Proben entnommen. Die LPL-A wurde deaktiviert (5 min bei 100 °C) und die Proteine anschließend in einer nativen PAGE aufgetrennt.

Zur Absicherung des Ergebnisses wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine in nativen Gelen getrennt und auf Membranen übertragen. Eine Membran wurde mit einem H-Protein-Antikörper (AK) inkubiert (Abb. 20A). Die Zunahme der Lipoylierung des H-Proteins wurde mit einer weiteren Membran und der Verwendung eines Liponsäure-AK nachgewiesen (Abb. 20B).

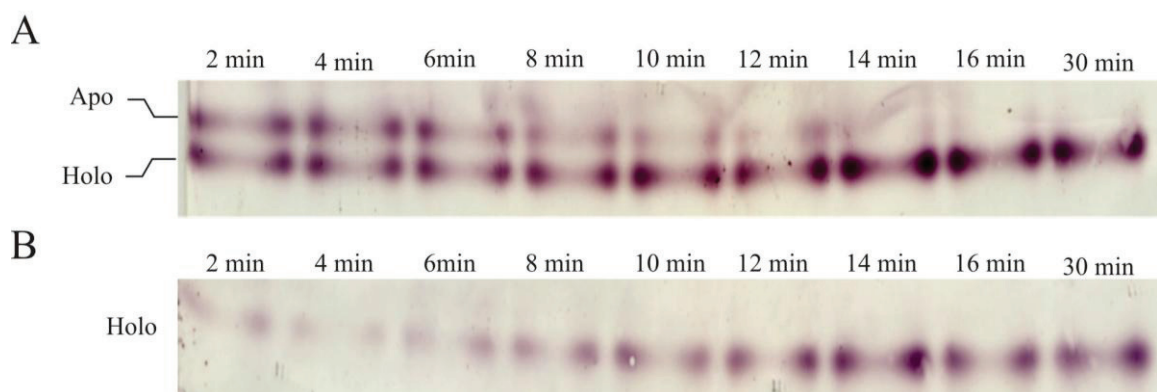


Abb. 20: Western-Blot-Analysen zur Überprüfung der *in vitro* Lipoylierung des H-Proteins FtGLDH. Einem Lipoylierungsansatz mit der LPL-A aus *E. coli* und dem H-Protein FtGLDH wurden in verschiedenen Zeitabständen Proben entnommen und die LPL-A für 5 min bei 100 °C deaktiviert. Die Proteinansätze wurden anschließend in nativen Acrylamid-Gelen getrennt, auf Membranen geblottet und ein immunochemischer Nachweis durchgeführt. Hierzu wurde Membran A mit einem H-Protein-AK und Membran B mit einem gegen Lipolat gerichteten AK inkubiert.

Dieses Experiment bestätigte, dass es sich bei der heterolog exprimierten LPL-A aus *E. coli* um ein funktionstüchtiges Enzym handelt, das zur *in vitro* Lipoylierung von H-Proteinen verwendet werden konnte. Alle zur Bestimmung der P-Protein-Aktivität verwendeten H-

Proteine wurden im weiteren Verlauf der Dissertation nach der Reinigung vollständig mit der LPL-A *in vitro* lipoyliert. Danach wurden die H-Proteine durch Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatografie nachgereinigt, um LPL-A sowie Liponsäure abzutrennen.

5.1.1.4. Massenspektrometrischer Nachweis der Lipoylierung von H-Proteinen

Die Überprüfung einer erfolgreichen Liponsäure-Modifikation war nicht bei allen H-Proteinen mit einer nativen PAGE möglich, da die Apo- und Holoproteine nicht klar voneinander differenzierbar waren. Die beste Möglichkeit zur Überprüfung des Lipoylierungsgrades dieser H-Proteine bot deshalb eine massenspektrometrische Analyse, mit der auch der Reinheitsgrad der untersuchten Proteinlösung überprüft werden konnte.

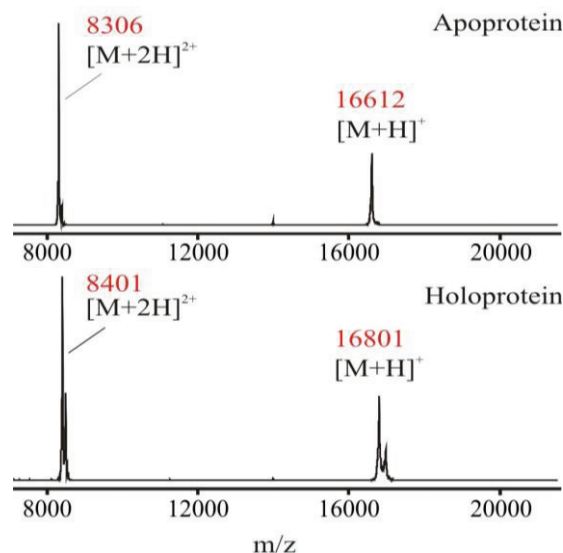


Abb. 21: Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen des H-Apo- und Holoproteins aus *Synechocystis*. Das Apoprotein wies (ohne Liponsäure, oben) die korrekte molekulare Masse des mit einem His-Tag ausgestatteten H-Proteins auf. Das Holoprotein mit der Liponsäure-Modifikation zeigt eine Massenzunahme von 189 Da. Diese entspricht der Bindung von Liponsäure an den konservierten Lysinrest des H-Proteins.

Für die massenspektrometrische Analyse mussten die untersuchten H-Proteine nicht proteolytisch verdaut werden, sondern konnten als vollständige Moleküle ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt werden (direkter Modus). Dieses Verfahren erlaubte die Bestimmung der Gesamtmassen der vermessenen H-Protein-Moleküle, wie es am Beispiel der H-Apo- und Holoproteine aus *Synechocystis* gezeigt ist (Abb. 21). Die ermittelte Masse des Apoproteins von 16612 Da entsprach genau der theoretischen Molmasse. Das durch das Starccodon ATG kodierte N-terminale Methionin wurde durch den Expressionsstamm entfernt. Die ermittelte Masse des H-Holoproteins betrug 16801 Da. Die gemessene Massendifferenz zwischen Apo- und Holoprotein beträgt demnach 189 Da. Freie Liponsäure besitzt jedoch eine Molmasse von 206,33 Da. Während der Lipoylierung des H-Proteins wird eine Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe der Liponsäure und der Aminogruppe der Lysin-

Seitenkette gebildet (Abb. 22). Dabei wird ein Wassermolekül freigesetzt, was eine Massenabnahme von 18 Da gegenüber der Summierung der Einzelmoleküle ergibt (Apoprotein + Liponsäure). Die Massenzunahme von nur 189 gegenüber den 206 der freien Liponsäure ist also durch die Freisetzung des Wassermoleküls erklärbar. Mit den massenspektrometrischen Analysen wurde die vollständige Lipoylierung des *Synechocystis* H-Proteins verifiziert (Abb. 21).

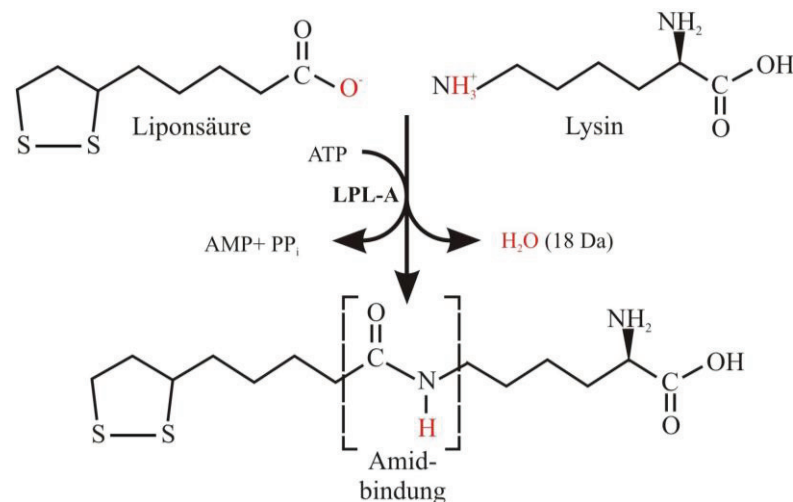


Abb. 22: Schematische Darstellung der durch die LPL-A katalysierten kovalenten Bindung der Liponsäure an den konservierten Lysinrest der H-Proteine. Während der Reaktion wird die Liponsäure aktiviert. Dabei wird ATP zu AMP + PP_i verbraucht. Bei der Bildung der Amidbindung wird ein Wassermolekül freigesetzt.

Die massenspektrometrischen Analysen der pflanzlichen Proteine ergaben ein identisches Bild. Im Gegensatz zu dem *Synechocystis* H-Protein wurde jedoch auf die Überprüfung der jeweiligen H-Apoproteine verzichtet, da diese im Gegensatz zum *Synechocystis* H-Protein nicht biochemisch charakterisiert wurden. Zusätzlich zum Grad der Lipoylierung wurde mit den massenspektrometrischen Analysen die Insertion der zwei Alanin-Moleküle in die H-Proteine FtGLDH^{AA} und AtGLDH1^{AA} überprüft. Dies war durch eine Molmassenerhöhung von 142 Da gegenüber FtGLDH bzw. AtGLDH1 nachweisbar (Abb. 23).

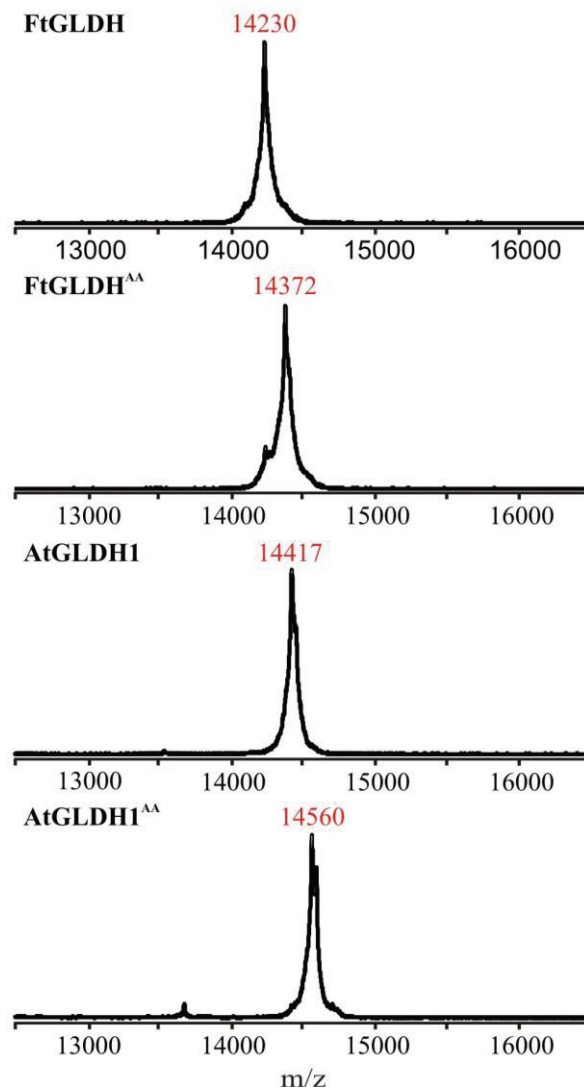


Abb. 23: Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen der pflanzlichen H-Holoproteine. Die heterolog in pET3a exprimierten H-Proteine besitzen keinen Affinitätstag und sind damit identisch zu den reifen mitochondrialen H-Proteinen. Das N-terminale Methionin wurde durch den Expressionsstamm entfernt. Bei allen Proteinen konnte eine vollständige Lipoylierung nachgewiesen werden. Ebenso war die Insertion der beiden Alanin-Moleküle in FtGLDH^{AA} und AtGLDH1^{AA} durch die Massenzunahme von 142 Da nachweisbar.

5.1.2. Expression und Reinigung von Proteinen zur Kristallisation

Um weitere Erkenntnisse über die GCS-Funktion und eine evtl. Komplexbildung zu erhalten, wurde die Kristallisierung von GCS-Proteinen angestrebt. Für dieses Ziel mussten spezielle Reinigungsverfahren entwickelt werden, um homogene Proteine mit Eignung zur Kristallbildung zu erzeugen.

5.1.2.1. Expression und Reinigung des L-Proteins

Nach der heterologen Expression des L-Proteins wurde nach dem initialen Reinigungsschritt (IMAC) eine gelbe Proteinlösung von den Säulen eluiert. Mit dem erhaltenen Isolat wurde danach zunächst ein Ionenaustausch mit einer MonoQ-Säule durchgeführt (Abb. 24). Das von der Austauschersäule eluierte L-Protein war in seiner Ladung sehr homogen (Abb. 24). Das Enzym eluierte in einem schmalen Konzentrationsbereich von ca. 17-20 % Puffer B, was einer Konzentration von 170-200 mM NaCl entsprach. Die homogene Ladung des zu kristallisierenden Proteins ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteinkristallisation, da Proteine gleicher Ladung sich besser in einer Gitterstruktur anordnen können.

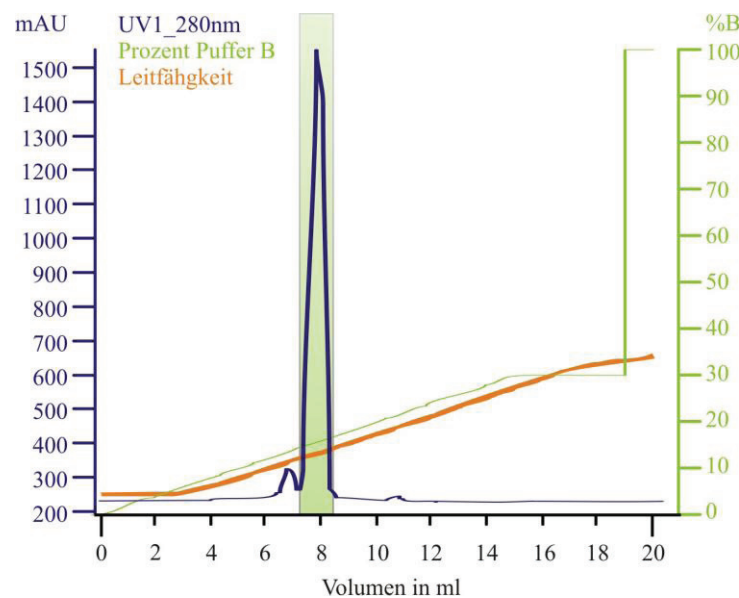


Abb. 24: Chromatogramm des Ionenaustausches mit dem *Synechocystis* L-Protein. Verwendet wurde eine MonoQ- Säule mit einem Volumen von 1 ml. Zur Elution des L-Proteins wurde ein NaCl-Gradient von 0-0,5 M verwendet. Die mit dem grünen Rahmen gekennzeichneten Proteinfraktionen wurden vereinigt, konzentriert und anschließend weiter genutzt.

Neben der Ladung spielt auch die Proteingröße für die erfolgreiche Proteinkristallisation eine entscheidende Rolle. Die Proteine sollten ausreichend homogen bezüglich der Molmasse sein. Proteine mit mehreren Untereinheiten wie das L- und P-Protein könnten bei der Expression und Reinigung in verschiedenen oligomeren Zuständen (Monomer, Dimer) vorkommen. Als finaler Reinigungsschritt wurde daher eine Größenausschlusschromatografie mit einer Superdex-200 Säule durchgeführt (Abb. 25), mit der auch etwaige Proteinaggregate aus der Lösung entfernt werden konnten.

Die aufgetrennte L-Proteinlösung enthielt aggregiertes Protein (Abb. 25, Fraktionen bei ca. 45 ml). Bei einem Elutionsvolumen von 60 ml war ein homogener Peak feststellbar. Die Eluate dieses Peaks wurden für die weiteren Kristallisationsexperimente genutzt. Eine Aussage über den oligomeren Status des eluierten L-Proteins war nicht möglich, da die

verwendete Größenausschlusssäule nicht geeicht war. Während des finalen Konzentrationsschrittes durchwanderte das L-Protein keine Membran mit einer Ausschlussgröße von 100 kD, wodurch der dimere Status des gereinigten Proteins indirekt nachgewiesen wurde. Die finale L-Protein-Lösung war frei von Verunreinigungen mit Fremdproteinen (Abb. 26).

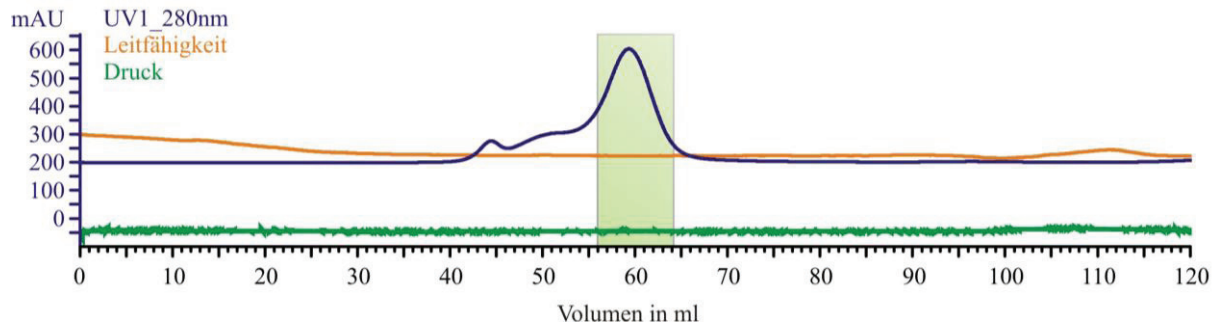


Abb. 25: Chromatogramm der Größenausschlusschromatografie mit dem *Synechocystis* L-Protein. Für die Chromatografie wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule genutzt. Das mit dem grünen Rahmen markierte Eluat wurde vereinigt, konzentriert und für die kristallografischen Ansätze verwendet.

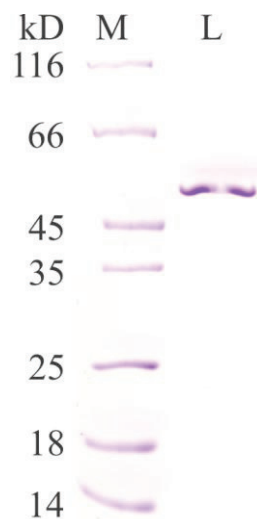


Abb. 26: SDS-PAGE des gereinigten L-Proteins

5.1.2.2. Expression, Reinigung und Reinigungsoptimierung des P-Proteins

Die erfolgreiche Reinigung des *Synechocystis* P-Proteins mittels IMAC wurde bereits unter Punkt 5.1.1 gezeigt. Für diese Proteinisolate wurden jedoch keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden. Deshalb wurde das Reinigungsprotokoll modifiziert und zusätzlich eine Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatografie durchgeführt. Für die Kultivierung der Expressionskulturen wurde anfangs LB-Medium genutzt. Die Ladungsverteilung des aus diesen Kulturen isolierten P-Proteins war jedoch sehr heterogen

(Abb. 27). Es wurden zwei Peaks (Peak A und B) erhalten, die für die weiteren chromatografischen Analysen getrennt bearbeitet wurden.

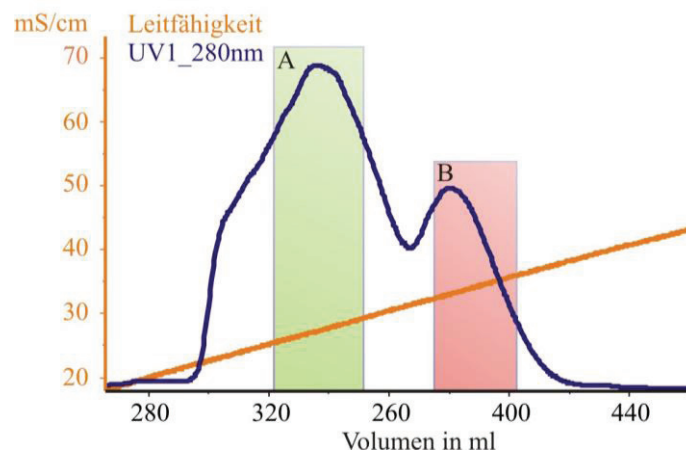


Abb. 27: Ionenaustauschchromatogramm mit dem *Synechocystis* P-Protein nach Expression in LB-Medium. Es wurde eine MonoQ-Säule mit einem Volumen von 8 ml verwendet. Zur Elution des P-Proteins wurde ein NaCl-Gradient von 0-0,5 M genutzt. Die Fraktionen A (grüner Rahmen) und B (roter Rahmen) wurden vereinigt, konzentriert und anschließend weiter analysiert.

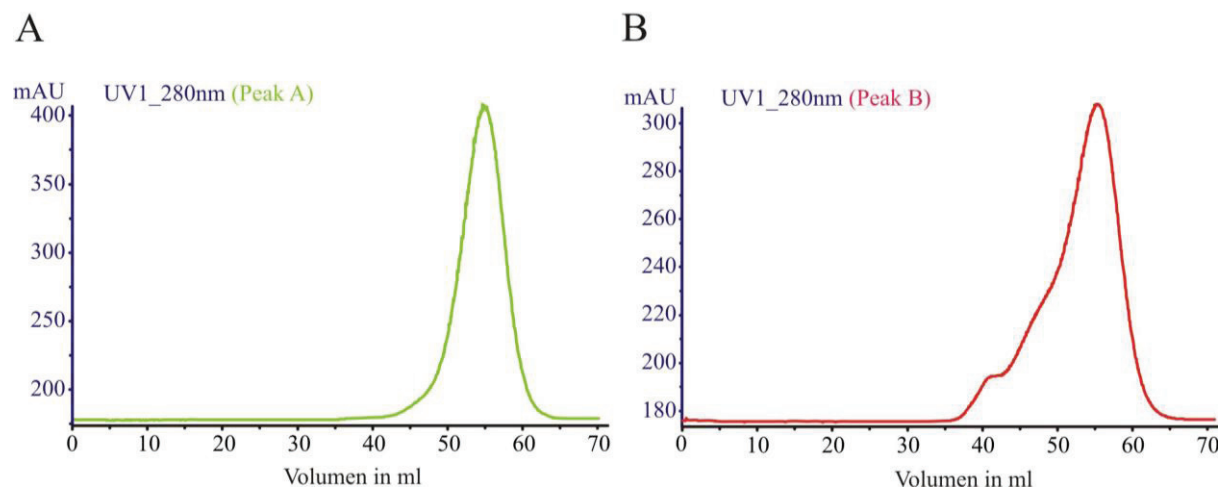


Abb. 28: Größenausschlusschromatografie mit dem *Synechocystis* P-Protein. Für die Chromatografie wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule verwendet. In Bild A wurden die P-Protein-Fractionen des Peaks A aufgetrennt (Abb. 27, grün). Die rechte Seite (B) zeigt das Chromatogramm der P-Protein-Fractionen des Peaks B (Abb. 27, rot).

Die Fraktionen der Peaks A bzw. B (Abb. 27) wurden konzentriert und weiter mit einer Größenausschlusschromatografie aufgereinigt. Während mit den Proteinmolekülen des Peaks A ein sehr homogenes Chromatogramm erhalten wurde (Abb. 28A), zeigte das Chromatogramm des Peaks B ein verändertes Bild. Die Proteinmoleküle dieses Isolats enthielten deutlich mehr Proteinaggregate (Abb. 28B), die bei einem Volumen von ca. 40 ml eluiert wurden. Darauf folgte ein Peak, der den größten Teil des P-Proteins enthielt und identisch zu Peak A (Abb. 28) war. Die festgestellte Ladungsdifferenz des exprimierten P-Proteins war für die folgenden Kristallisationsexperimente sehr ungünstig. Durch die

Auftrennung des Isolats in zwei Peaks mit unterschiedlicher Ladung verringerte sich die Menge an nutzbarem Enzym und der finale Reinigungsschritt, die Größenausschlusschromatografie, musste zweimal durchgeführt werden.

Zur Optimierung der P-Protein-Gewinnung wurde das Kultivierungsmedium 2YT getestet, das deutlich mehr Nährstoffe als LB-Medium enthält. Als erster Reinigungsschritt nach der Expression wurde eine IMAC mit dem Bakterienextrakt durchgeführt. Der im Anschluss durchgeführte Ionenaustausch zeigte gegenüber der Abb. 27 ein deutlich verändertes Bild. Fast das gesamte P-Protein wurde in nur einem Peak bei einem Salzgehalt von ca. 30-35 mS/cm eluiert (Abb. 29A). Die Fraktionen dieses Peaks (grüner Rahmen) wurden vereinigt, konzentriert und chromatografisch mit einer Superdex 200-Säule aufgetrennt (Abb. 29B). Das erhaltene Chromatogramm zeigte eine sehr homogene Größenverteilung des isolierten Proteins ohne ein Vorkommen von Proteinaggregaten.

Die mit dem grünen Rahmen markierten Fraktionen der Größenausschlusschromatografie (Abb. 29B) wurden anschließend vereinigt, konzentriert und sofort für Kristallisationsexperimente verwendet. Im weiteren Verlauf wurde ausschließlich 2YT als Expressionsmedium genutzt.

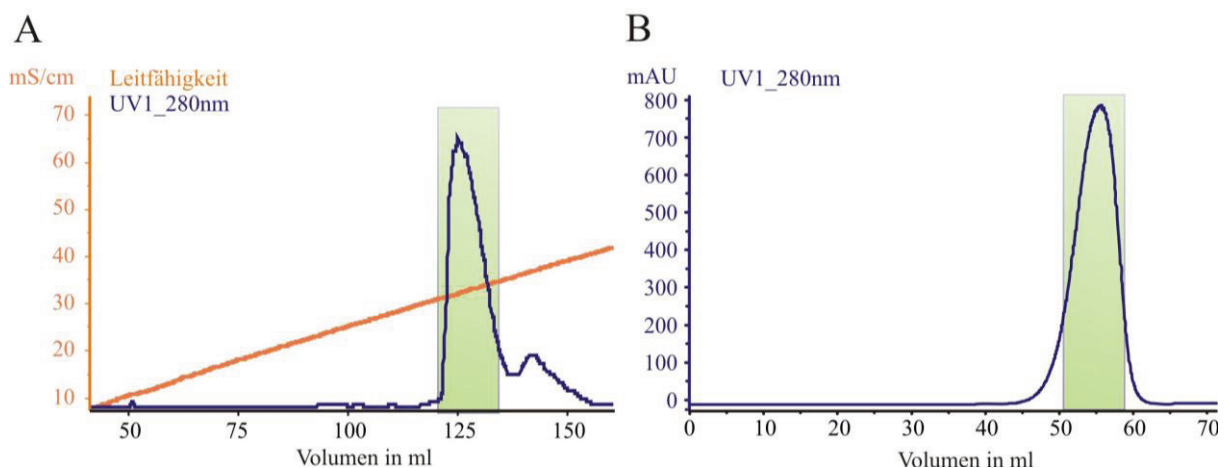


Abb. 29: Chromatogramm der Ionenaustausch- (A) und Größenausschlusschromatografie (B) mit dem *Synechocystis* P-Protein nach Expression in 2YT-Medium. Für den Ionenaustausch wurde eine MonoQ-Säule und für die Größenausschlusschromatografie eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule verwendet. Die P-Protein-Fraktionen aus A (grüner Rahmen) wurden vereinigt und in B weiter gereinigt. Die mit einem grünen Rahmen markierten Fraktionen aus B wurden für die kristallografischen Ansätze verwendet.

5.1.2.3. Expression und Reinigung des Selenomethionin-markierten P-Proteins

Eine große Herausforderung bei der Erstellung eines Proteinstrukturmodells ist die Lösung des Phasenproblems. Zur Aufklärung der dreidimensionalen Elektronendichtekarte des zu untersuchenden Proteins müssen die Amplituden, Frequenzen und Phasen aller auf dem Detektor aufgetroffenen Röntgenstrahlen ermittelt werden. Während die Amplituden und Frequenzen direkt aus den Beugungsmustern entnommen werden können, müssen die Phasen

durch weitere Experimente ermittelt werden. Eine Möglichkeit stellt die Synthese von Substitutionsproteinen dar. Die gebräuchlichste Methode ist dabei der Einbau von Selenomethionin. Das Ziel dabei ist die vollständige Ersetzung aller im Proteinmolekül vorkommenden Methionine durch Selenomethionin. Dies wird sehr häufig durch die Verwendung eines Methionin-auxotrophen Expressionsstammes erreicht. Diesem wird während der heterologen Proteinsynthese über das Kultivierungsmedium Selenomethionin bereitgestellt.

Für die Synthese des Substitutionsproteins wurde der Expressionsstamm BL21-AI in Verbindung mit einem modifizierten M9-Minimalmedium verwendet. (Tabelle 4). Als C-Quelle wurde aufgrund der Induzierbarkeit des Arabinose-Promotors nicht Glukose, sondern Glycerol genutzt. Der erste Reinigungsschritt des Selenomethionin-markierten P-Proteins war wiederum die IMAC. Mit dem gereinigten P-Protein wurde danach ein Ionenaustausch durchgeführt (Abb. 30A), bei dem erneut eine Ladungsdifferenz im vorliegenden Proteinisolat sichtbar wurde. Während des ersten Reinigungsschrittes (IMAC) wurde DNA co-eluiert. Diese bindet jedoch stärker an das Austauschermaterial als das P-Protein und konnte deshalb aus der Proteinlösung entfernt werden. Die DNA wurde während des Regenerationsschrittes von der MonoQ-Säule eluiert (100 % Puffer B, Abb. 30A). Die Proteinfraktionen des grün markierten Proteinpeaks wurden danach vereinigt und konzentriert. Anschließend fand die Untersuchung der Massenverteilung der Moleküle des isolierten Substitutionsproteins mit einer Superdex 200-Säule statt (Abb. 30B). Das Chromatogramm dieses finalen Reinigungsschrittes offenbarte eine leichte Verunreinigung des Isolats mit Proteinaggregaten (Elution bei ca. 40 ml). Danach folgt ein sehr homogener Peak, dessen Fraktionen vereinigt, konzentriert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurden.

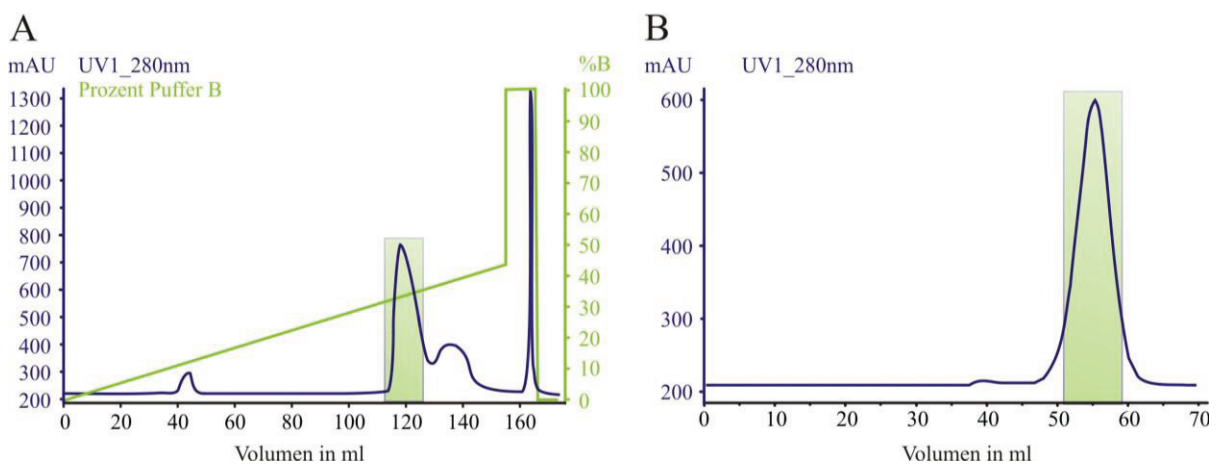


Abb. 30: Chromatogramm der Ionenaustausch- (A) und Größenausschlusschromatografie (B) des Selenomethionin-markierten *Synechocystis* P-Proteins. Für den Ionenaustausch wurde eine MonoQ-Säule und für die Größenausschlusschromatografie eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule verwendet. Die P-Protein-Fractionen aus A (grüner Rahmen) wurden vereinigt und im Chromatogramm B weiter aufgetrennt. Die mit einem grünen Rahmen markierten Fractionen aus B wurden vereinigt, konzentriert und für die kristallografischen Ansätze genutzt.

Die zur Kontrolle des finalen Isolats durchgeführte SDS-PAGE (Abb. 31) zeigt hochgradig aufgereinigtes Selenomethionin-P-Protein. Die erhaltene Lösung war sehr homogen und frei von Fremdproteinen.

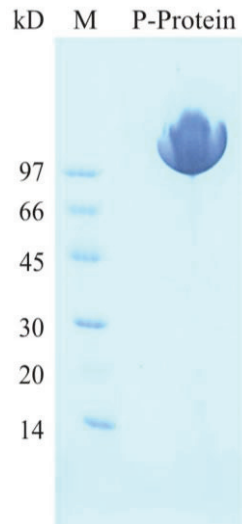


Abb. 31: SDS-PAGE des Selenomethionin-markierten P-Proteins. Zur elektrophoretischen Trennung wurde das PhastSystemTM (GE Healthcare, Uppsala) mit einem Gradientengel (8-25 %) verwendet.

5.1.2.4. Untersuchung der Oligomerisierung von H-Proteinen mit Glycin- und Tricin-SDS-PAGE

Die H-Protein-Oligomerisierung wurde mit den H-Proteinen aus *Synechocystis* und *E. coli* sowie den pflanzlichen H-Proteinen FtGLDH und AtGLDH1 aus *F. trinervia* bzw. *A. thaliana* untersucht. Es ist bekannt, dass sich eine Tricin-SDS-PAGE zur Auftrennung von kleinen Proteinen besser eignet als die Glycin-SDS-PAGE (Schagger, 2006). Dies liegt an der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität der Folgeionen (Glycin bzw. Tricin) gegenüber der Mobilität der aufgetrennten Proteine. Deshalb wurden für die folgenden Experimente beide Systeme miteinander verglichen. Außerdem wurden für jedes untersuchte Protein vier verschiedene Ladepuffer verwendet. Darunter befanden sich drei speziell für dieses Experiment angesetzte Ladepuffer: Puffer 1 (SDS) enthielt DTT und SDS zur denaturierenden Auftrennung der Proteine. Puffer 2 (Nat.) enthielt keine denaturierenden Agenzien und Puffer 3 (DTT) enthielt nur DTT, jedoch kein SDS. Zur Kontrolle dienten die Standard-Protein-Ladepuffer für die jeweiligen Gelsysteme (3fach Laemmli bzw. 2fach Tricin-Ladepuffer).

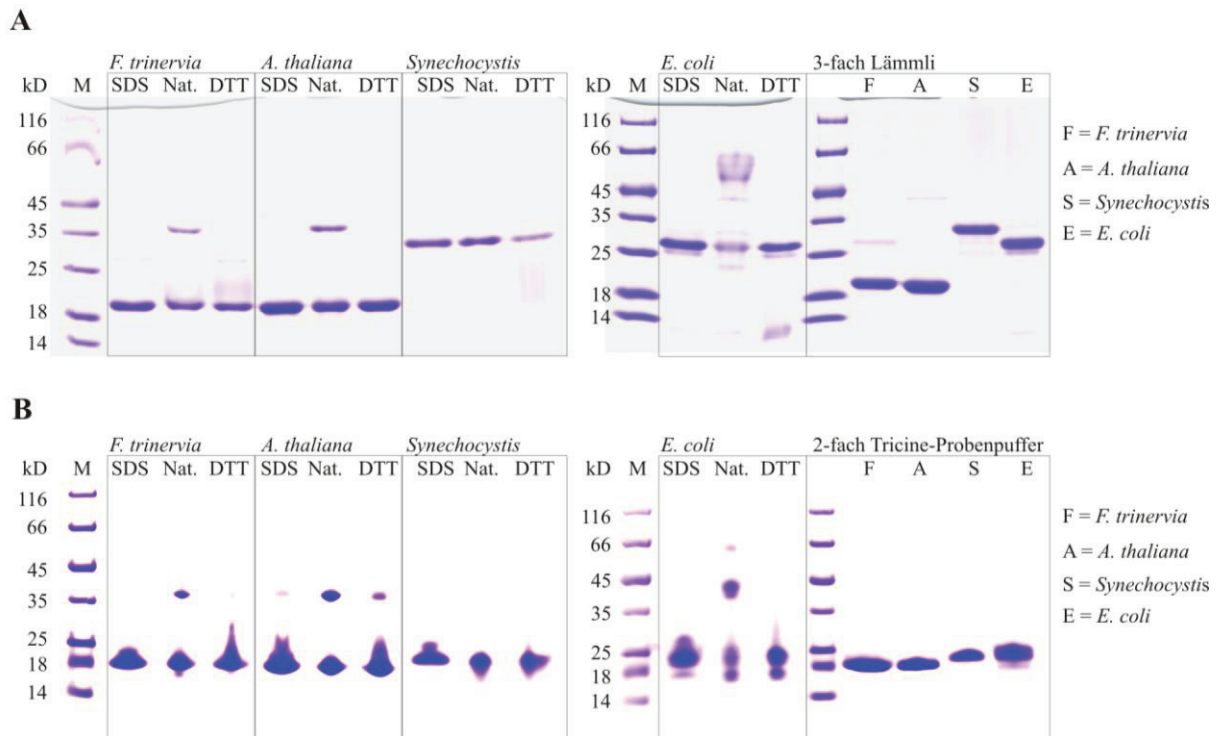


Abb. 32: Glycin-SDS-PAGE (A) und Tricin-SDS-PAGE (B) mit verschiedenen verschiedenen pro- und eukaryotischen H-Proteinen. Für die Auftrennung wurden verschiedene Ladepuffer verwendet. Zur Analyse wurden die H-Proteine FtGLDH und AtGLDH1 aus *F. trinervia* bzw. *A. thaliana* sowie die H-Proteine aus *Synechocystis* und *E. coli* genutzt.

Die Verwendung des nativen Ladepuffers führte bei den pflanzlichen H-Proteinen zum Auftreten einer zusätzlichen Proteinbande in der Glycin-SDS-PAGE (Abb. 32A). Diese zusätzlichen Proteinbanden hatten eine Größe von ca. 35 kD und erinnerten damit an die Ergebnisse der bakteriellen H-Proteine aus Abb. 13. Bei der Verwendung des SDS- bzw. DTT-haltigen Probenpuffers zeigten die pflanzlichen H-Proteine ihr schon vorher beobachtetes Laufverhalten (Abb. 13) Dagegen hatte die Nutzung unterschiedlicher Ladepuffer auf das Migrationsverhalten des *Synechocystis* H-Proteins keinen Einfluss. Mit dem H-Protein aus *E. coli* wurden bei Verwendung des nativen Probenpuffers weitere diffus erscheinende Banden mit höherer und teilweise auch geringerer Molmasse sichtbar. Mit dem Standard-Laemmli-puffer wiesen alle untersuchten H-Proteine ihr schon vorher beobachtetes Laufverhalten auf (Abb. 13).

Anschließend wurden die gleichen Proteine mit einer Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 32B). Hier fiel die negative Beeinflussung des Laufverhaltens und die geringe Bandenschärfe der Proteine bei der Verwendung der Laemmli-Puffer (SDS, Nat., DTT) auf. Erstaunlich war jedoch, dass die H-Proteine aus *Synechocystis* und *E. coli* im Gegensatz zur Glycin-SDS-PAGE bei einer Molmasse von ca. 20 kD migrierten. Dies entspricht in etwa der Größe eines bakteriellen H-Protein-Monomers. Vor allem das elektrophoretische Laufverhalten des H-Proteins aus *E. coli* war bei Verwendung der Laemmli-Puffer (SDS, Nat, DTT) sehr diffus. Das *E. coli* H-Protein sowie die pflanzlichen H-Proteine wiesen mit dem nativen Probenpuffer erneut ein deutlich verändertes Laufverhalten auf. Wie bei der Glycin-SDS-PAGE (A) wurde

auch mit dem Tricin-SDS-System eine zusätzliche Bande auf der Höhe von ca. 35 kD beobachtet. Durch Nutzung des Tricin-Standardladepuffers wurde eine deutlich verbesserte Bandenschärfe der aufgetrennten Proteine erreicht.

Die gewonnenen Ergebnisse waren teilweise widersprüchlich. Würde das Migrationsverhalten der bakteriellen H-Proteine in der Glycin-SDS-PAGE für eine Dimerisierung sprechen, so zeigen die gleichen Proteine in der Tricin-SDS-PAGE die Eigenschaften monomer H-Proteine. Auch mit den pflanzlichen H-Proteinen wurden Hinweise auf eine Protein-Dimerisierung erhalten. Diese Ergebnisse erforderten zusätzliche Experimente zur Aufklärung des Oligomerisierungsstatus der H-Proteine.

5.1.2.5. Untersuchung der H-Protein-Oligomerisierung mit Größenausschlusschromatografie

Die Größenausschlusschromatografie ist eine bewährte Methode zur Bestimmung der Molmassen von Makromolekülen in ihrer nativen Form. Die Methode macht sich einen inversen Siebeffekt zunutze, der durch die Verwendung eines porösen Gels als Säulenmatrix entsteht. Dabei durchwandern größere Moleküle die Matrix schneller als kleine Moleküle. Die Nutzung dieser Methode bietet außerdem die Möglichkeit, die Größe von unbekannten Makromolekülen zu bestimmen. Dafür muss man die verwendete Größenausschlussssäule kalibrieren, indem die Elutionsvolumina von Proteinen mit bekannter Größe bestimmt werden.

Zur Massenanalyse wurde eine Superdex 200-Säule mit einem Volumen von 120 ml verwendet. Als Probenpuffer wurde ein Tris-Puffer mit niedrigem Salzgehalt (50 mM NaCl) gewählt und die Elutionsvolumina von Proteinen mit bekannter Molmasse bestimmt (Tabelle 29). Das Ausschlussvolumen der Säule wurde mit Blue Dextran ermittelt. Dieses besitzt eine Molmasse von 2000 kD und dringt deshalb nicht in die Poren der Matrix ein. Das Elutionsvolumen von Blue Dextran wird deshalb auch als Ausschlussvolumen V_0 bezeichnet. Es beschreibt das Flüssigkeitsvolumen außerhalb der Gelpartikel. Das Elutionsvolumen von Molekülen, die dem Siebeffekt unterliegen (Elutionsvolumen $> V_0$), wird mit V_e abgekürzt.

Tabelle 29: Elutionsvolumina V_e von Standardproteinen nach Auftrennung mit einer Superdex 200-Säule zur Erstellung einer Eichgeraden. Das Ausschlussvolumen V_o betrug 45,5 ml.

Protein	V_e in ml	V_e/V_o	MW in Da	logMW
β -Amylase	64,5	1,42	200000	5,30
Alkohol Dehydrogenase	69,5	1,53	150000	5,18
Albumin	76,5	1,68	66000	4,82
<i>carbonic anhydrase</i>	91	2	33000	4,46
Cytochrom c	103,5	2,27	12400	4,09

Die berechneten Koeffizienten V_e/V_o (x-Achse) der einzelnen Standardproteine wurden gegen die Logarithmen ihrer Molmassen in einem xy-Punktdiagramm aufgetragen und eine lineare Abhängigkeit erhalten (Abb. 33). Aus dieser wurde die Formel der Eichgerade zur Bestimmung der Molmassen von unbekannten Proteinen ermittelt ($y = -1,4102x + 7,2809$). Dabei müssen die Massen der zu untersuchenden Proteine innerhalb des Bereiches der verwendeten Standardproteine liegen (12,4 kD – 200 kD). Wenn das unbekannte Protein unter identischen Laufbedingungen (Flussrate, Druck, aufgetragenes Volumen, Puffer) aufgetrennt wird, kann man aus dem erhaltenen Elutionsvolumen mithilfe der Eichgeraden logMW berechnen.

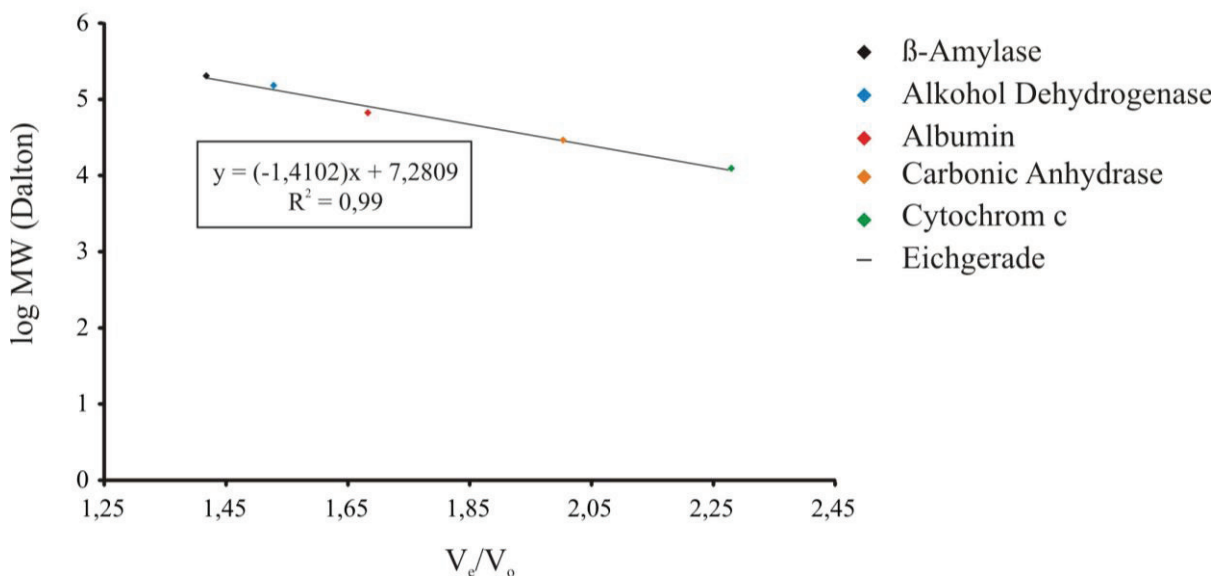


Abb. 33: Eichgerade der Größenausschusssäule Superdex 200. Zur Erstellung wurden folgende Proteine mit bekannter Größe verwendet: β -Amylase, Alkohol Dehydrogenase, Albumin, *carbonic anhydrase* und Cytochrom c. Der Quotient aus dem Elutionsvolumen (V_e) und dem Ausschlussvolumen (V_o) wurde gegen den Logarithmus der Massen aufgetragen. Die Formel der Eichgeraden sowie deren Bestimmtheitsmaß (R^2) sind im Kasten unter der Geraden angegeben.

Tabelle 30: Retentionsvolumina sowie daraus berechnete Molmassen von H-Proteinen nach Größenchromatografischen Analysen

Protein	V _e in ml	V _e /V ₀	logMW	MW in kD
<i>F. trinervia</i> GLDH	92	2,022	4,43	27
	75,5	1,66	4,94	87
<i>A. thaliana</i> GLDH1	75,5	1,66	4,94	87
	91	2	4,46	29
	97,5	2,14	4,26	18
<i>Synechocystis</i>	88	1,93	4,56	35
<i>E. coli</i>	72	1,58	5,05	112
	90	2	4,46	29

Nach der Eichung wurden die pflanzlichen H-Proteine FtGLDH und AtGLDH1 sowie die bakteriellen H-Proteine aus *Synechocystis* und *E. coli* analysiert (Tabelle 34, Abb. 34). Für alle untersuchten H-Proteine wurde die Bildung von hochmolekularen Proteinaggregaten nachgewiesen, deren Elutionsvolumina dem Ausschlussvolumen V₀ der verwendeten Säule entsprachen. Die Auftrennung des H-Proteins FtGLDH ergab weiterhin einen Peak bei einem Retentionsvolumen von 92 ml, der nahezu identisch mit dem H-Protein aus *A. thaliana* (AtGLDH1) war. Die berechneten Molmassen betrugen 27 kD (FtGLDH) bzw. 29 kD (AtGLDH1). Dieses Ergebnis würde für eine Dimerisierung beider H-Proteine unter nativen Bedingungen sprechen. Während der chromatografischen Auftrennung des *Arabidopsis* H-Proteins wurden darüber hinaus noch weitere Peaks erhalten. Zum Beispiel bei einem Elutionsvolumen von 75,5 ml. Ein identischer Peak deutet sich ebenso bei dem H-Protein FtGLDH an. Die berechnete Größe der Proteine dieses Peaks beträgt ca. 87 kD. Des Weiteren ergab die Auftrennung des H-Proteins AtGLDH1 einen Peak bei 97,5 ml. Dieses Elutionsvolumen entspricht einer Proteingröße von 18 kD und damit einem monomeren H-Protein. Die vermeintliche Dimerisierung der bakteriellen H-Proteine wurde ebenfalls mit der Größenausschlusschromatografie bestätigt. Anhand der Chromatogramme der bakteriellen H-Proteine von *Synechocystis* und *E. coli* wurden Molmassen von 35 kD (88 ml) bzw. 29 kD (90 ml) berechnet. Während der Auftrennung des *E. coli* H-Proteins wurde noch ein weiterer Peak mit einem Retentionsvolumen von 72 ml ermittelt, der eine Molmasse von 112 kD andeutet. Offensichtlich neigt dieses Protein stärker zur Bildung von höher molekularen Proteinaggregaten. Die mit diesem Experiment erhaltenen Ergebnisse legen allgemein die Bildung von H-Protein-Dimeren oder höhermolekularer H-Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen nahe.

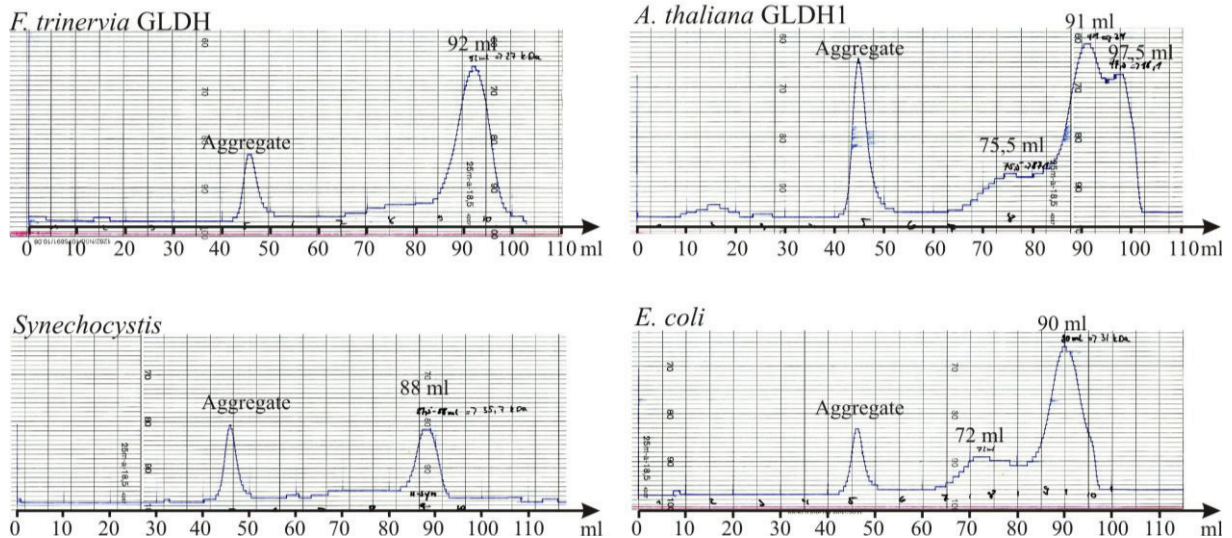


Abb. 34: Größenchromatografische Analysen zur Ermittlung der Molmassen von H-Proteinen. Untersucht wurden die pflanzlichen H-Proteine FtGLDH und AtGLDH1 bzw. die bakteriellen H-Proteine aus *Synechocystis* und *E. coli*.

5.2. Enzymatische Messungen

5.2.1. Aktivität des *Synechocystis* P-Proteins mit dem *Synechocystis* H-Protein

Für die Etablierung der Struktur-Funktionsanalyse war eine eingehende biochemische Charakterisierung des *Synechocystis* P-Proteins erforderlich. Zu Beginn der Experimente wurde das pH-Optimum der Austauschreaktion ermittelt. Erwartet wurde ein Optimum von pH 8, was in etwa dem zytosolischen pH-Wert eines belichteten Cyanobakteriums entspricht (Raven, 2006). Als Substrat für die Reaktion des P-Proteins wurden lipoyliertes H-Protein, Glycin und ^{14}C - verwendet. Das Optimum der Austauschreaktion wurde unerwartet bei pH 6 festgestellt (Abb. 35A). In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob die über den Zeitraum von 1 h gemessene Reaktion einen linearen Verlauf hat. Dies wurde verifiziert (Abb. 35B) und war eine Voraussetzung zur korrekten Bestimmung der biochemischen Parameter des *Synechocystis* P-Proteins. Überraschenderweise konnte auch ohne den Zusatz von H-Protein Enzymaktivität ($0,015 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gemessen werden. Diese war jedoch im Vergleich zu einem Ansatz mit H-Protein als Aminomethylen-Akzeptor um etwa den Faktor 100 geringer ($1,26 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Um diese P-Protein-Aktivität ohne H-Protein-Zusatz feststellen zu können, musste 20-mal mehr P-Protein eingesetzt werden als in vergleichbaren Ansätzen mit H-Protein (Abb. 35B, roter Graph). Zur Kontrolle wurden ebenfalls Ansätze ohne Zusatz von Glycin vermessen, mit denen jedoch keine Enzymaktivität gemessen werden konnte.

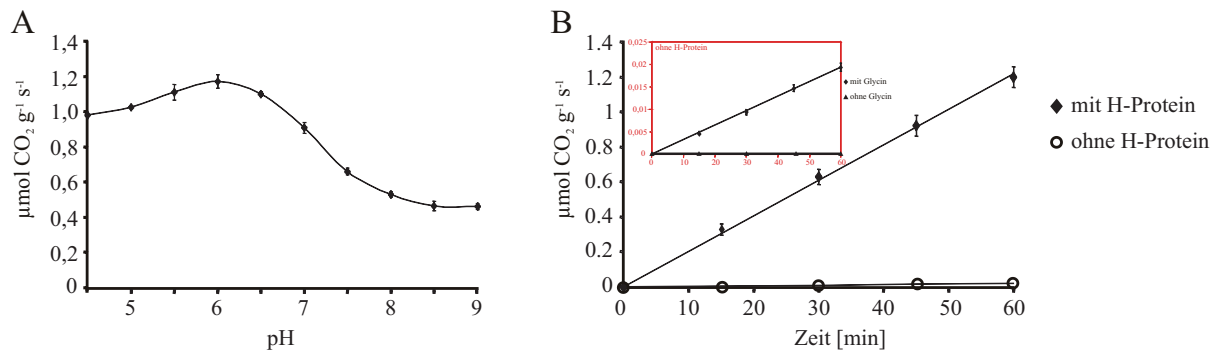


Abb. 35: Messungen der P-Protein-Aktivitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert (A) und der Zeit (B) (Hasse *et al.*, 2007). A: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,16 µM) mit H-Protein-Zusatz (4,6 µM, Vierecke) in Abhängigkeit vom pH-Wert. B: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,16 µM) mit H-Protein-Zusatz (4,6 µM, Diamanten) und ohne H-Protein (Kreise) bei pH 6 in Abhängigkeit von der Zeit. Der eingeschobene rote Graph ist die Vergrößerung der P-Protein-Aktivität ohne H-Protein (Viertecke). Ohne Zugabe von Glycine konnte keine Enzymaktivität gemessen werden (Dreiecke).

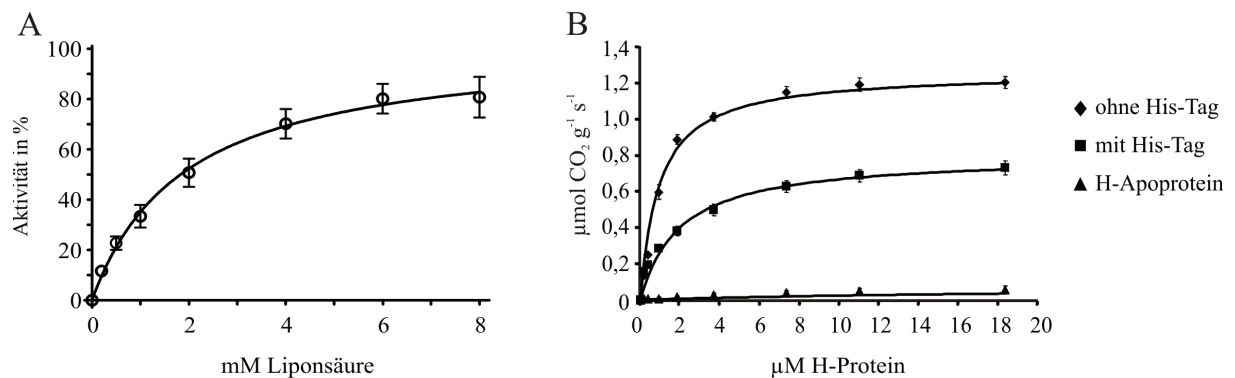


Abb. 36: Messungen der P-Protein-Aktivität in Abhängigkeit von Liponsäure (A) und dem H-Protein (B) (Hasse *et al.*, 2007). A: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (4,6 µM) mit Liponsäure als Aminomethylen-Akzeptor. B: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,16 µM) mit heterolog exprimiertem *Synechocystis* H-Protein ohne His-Tag (Diamanten), mit His-Tag (Viertecke) bzw. mit H-Apoprotein inklusive His-Tag (Dreiecke) als Aminomethylen-Akzeptor.

Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass Liponsäure zum Teil die Funktion des H-Proteins übernehmen kann (Kochi & Kikuchi, 1976). Um dies zu überprüfen, wurde die Abhängigkeit der P-Protein-Aktivität von freier Liponsäure überprüft. Die maximale Aktivität, die mit freier Liponsäure erhalten werden konnte, lag etwa um den Faktor 5-10 über der P-Protein-Aktivität ohne Aminomethylen-Akzeptor (nicht gezeigt). Die Substratabhängigkeit des P-Proteins von freier Liponsäure zeigte eine typische Michaelis-Menten-Sättigungskinetik. Der K_m -Wert der Liponsäure betrug 2 mM (Abb. 36A). Die höchste Enzymaktivität wurde jedoch in Kombination mit dem H-Protein erreicht. Die biochemische Aktivität wurde mit drei unterschiedlichen *Synechocystis* H-Proteinen untersucht. Zum einen wurde der Einfluss des N-terminal fusionierten His-Tags auf die Enzymaktivität durch die Verwendung eines entsprechenden H-Proteins geprüft. Zum anderen wurde ein H-Protein vermessen, bei dem der Affinitätstag entfernt wurde. Ebenfalls verwendet wurde ein H-Apoprotein mit fusioniertem His-Tag. Die Substrateigenschaften der verschiedenen H-Proteine wurden außerdem bei zwei unterschiedlichen pH-Werten

vermessen. Zum einen bei einem pH-Wert von 8, was dem pH-Wert des cyanobakteriellen Zytosols entspricht, und zum anderen bei pH 6, dem pH-Optimum der Austauschreaktion. Mit allen verwendeten H-Proteinen wurden P-Protein-Aktivitäten mit Michaelis-Menten-Kinetiken festgestellt (Abb. 36B, Tabelle 31). Die höchste enzymatische Aktivität wurde mit dem H-Protein ohne His-Tag erreicht ($V_{\max} = 1,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bei einem berechneten K_m -Wert von $0,47 \mu\text{M}$ für das H-Protein. Der V_{\max} -Wert des H-Proteins mit His-Tag war ca. 35-45 % geringer ($0,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Tabelle 31). Damit konnte ein negativer Einfluss des His-Tags auf die P-Protein-Aktivität festgestellt werden. Dies spiegelte sich auch im leicht erhöhten K_m -Wert dieses H-Proteins gegenüber dem H-Protein ohne Affinitätstag wider (Tabelle 31).

Tabelle 31: Kinetische Parameter des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins bei verschiedenen pH-Werten mit unterschiedlichen H-Protein-Varianten bzw. ohne H-Protein. Lipo = lipoyliert, H-Apo = nicht lipoyliert, w/o Tag = ohne His-Tag, Tag = mit His-Tag, w/o H-Protein = ohne H-Protein, n.b. = nicht bestimmt

H-Protein	pH	K_m (Glycin) (mM)	K_m (H-Protein) (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
w/o Tag, Lipo	6	$3,21 \pm 0,26$	$0,47 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,06$
w/o Tag, Lipo	8	$2,92 \pm 0,10$	$12,3 \pm 0,60$	$1,29 \pm 0,06$
Tag, Lipo	6	$3,05 \pm 0,23$	$1,0 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,05$
Tag, Lipo	8	$3,14 \pm 0,15$	$12,6 \pm 0,08$	$0,73 \pm 0,06$
Tag, H-Apo	6	$2,93 \pm 0,21$	$12,3 \pm 0,30$	$0,08 \pm 0,002$
w/o H-Protein	6	$2,84 \pm 0,19$	n.b.	$0,015 \pm 0,0004$

Bei dem Vergleich der maximalen P-Protein-Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von den unterschiedlichen pH-Werten wurden keine Unterschiede festgestellt (Tabelle 31). Jedoch änderten sich die Substrateigenschaften der H-Proteine. Die gemessenen K_m -Werte für H-Proteine mit und ohne Affinitätstag waren bei pH 8 ca. 12fach höher als bei pH 6. Die maximale Enzymaktivität mit dem H-Apoprotein war sehr gering und ist wahrscheinlich auf eine minimale Verunreinigung der Apoproteinlösung mit H-Holoprotein zurückzuführen. Der K_m -Wert für Glycin beträgt 3 mM (Abb. 37, Tabelle 31) und blieb in Kombination mit allen untersuchten H-Protein-Varianten sowie ohne Aminomethylen-Akzeptor konstant. Auch die unterschiedlichen pH-Werte hatten keinen Einfluss auf den Glycin- K_m -Wert.

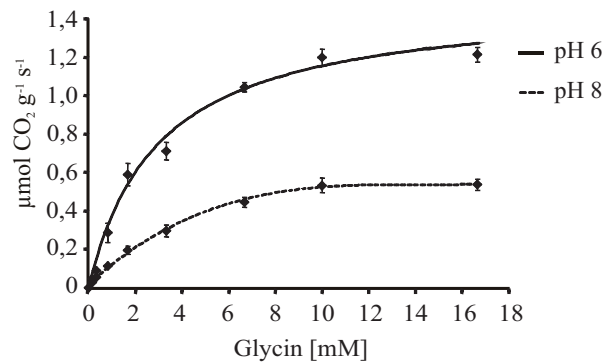


Abb. 37: Messungen der P-Protein-Aktivität in Abhängigkeit von der Glycin-Konzentration (Hasse *et al.*, 2007). Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins in Abhängigkeit von der Glycin-Konzentration bei pH 6 (0,16 μM P-Protein, durchgezogene Linie) und pH 8 (4,6 μM P-Protein, gestrichelte Linie).

5.2.2. Nutzung des *Synechocystis* P-Proteins zur Untersuchung der Substrateigenschaften von artfremden pro- und eukaryotischen H-Proteinen

5.2.2.1. Untersuchung der H-Proteine FtGLDH und FtGLDH^{AA} aus *Flaveria trinervia*

Nach der Charakterisierung der biochemischen Parameter des *Synechocystis* P-Proteins mit dem cyanobakteriellen H-Protein sollte die Interaktion mit eukaryotischen H-Proteinen untersucht werden. Es wurde schon früher von biochemischen Interaktionen artfremder P- und H-Proteine berichtet (Kikuchi *et al.*, 2008, Motokawa *et al.*, 1977). Jedoch wurden diese nicht biochemisch charakterisiert. Das homodimere *Synechocystis* P-Protein ist sehr ähnlich zu anderen eukaryotischen P-Proteinen (Hasse *et al.*, 2010). Daher sollte es möglich sein, die Substrateigenschaften eukaryotischer H-Proteine mit dem P-Protein aus *Synechocystis* zu untersuchen.

Sehr interessante Kandidaten waren die H-Proteine FtGLDH und FtGLDH^{AA} aus der C₄-Pflanze *Flaveria trinervia*. Die Gattung *Flaveria* besteht aus Arten, die zu den C₃, C₃-C₄-Intermediären und C₄-Pflanzen gehören (Bauwe & Chollet, 1986, Ku *et al.*, 1991). Deshalb eignet sich diese Gattung sehr gut für evolutionäre Untersuchungen zur Entstehung der C₄-Photosynthese. Die Art *F. trinervia* besitzt zwei H-Proteine, die durch reguliertes alternatives Spleißen aus einer prä-mRNA entstehen (Kopriva *et al.*, 1995). Während FtGLDH vorwiegend in den heterotrophen Pflanzenorganen synthetisiert wird, kommt FtGLDH^{AA} hauptsächlich in phototrophen Geweben vor. In dem H-Protein FtGLDH^{AA} sind, im Gegensatz zu FtGLDH, zwei zusätzliche Alanin-Moleküle nach den ersten zwei AS am N-Terminus des Proteins eingeschoben (Abb. 38). Ein möglicher Einfluss dieser Modifikation auf die GCS-Aktivität sollte durch die Verwendung des *Synechocystis* P-Proteins festgestellt werden.

FtGLDH	SS--VLDGLKYANSHEWVKHEG...
FtGLDH^{AA}	SSAAVLDGLKYANSHEWVKHEG...
AtGLDH1	ST--VLEGLKYANSHEWVKHEG...
AtGLDH^{AA}	STAAVLEGLKYANSHEWVKHEG...
	1.....10.....20.....

Abb. 38: Vergleich der N-terminalen Sequenzen der reifen H-Proteine FtGLDH und FtGLDH^{AA} aus der C₄-Pflanze *F. trinervia* sowie AtGLDH1 und AtGLDH1^{AA} aus *A. thaliana*. Das H-Protein AtGLDH^{AA} wurde durch gentechnische Methoden hergestellt.

Da der Affinitätstag einen negativen Einfluss auf die Substrateigenschaften des *Synechocystis* H-Proteins hat, wurde dieser bei allen folgenden Experimenten von den H-Proteinen entfernt. Es wurden biochemische Aktivitäten des *Synechocystis* P-Protein mit den H-Proteinen aus *F. trinervia* ermittelt (Abb. 39A) und somit bestätigt, dass eukaryotische H-Proteine als Co-Substrate für ein bakterielles P-Protein dienen können. Darüber hinaus wurde ein Unterschied zwischen den Michaelis-Menten-Kinetiken beider *Flaveria* H-Proteine festgestellt. Mit FtGLDH^{AA} ($V_{\max} = 4,1 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), dem H-Protein der phototrophen Gewebe, konnten deutlich höhere Enzymaktivitäten als mit FtGLDH ($V_{\max} = 3,5 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) erreicht werden. Die erhaltenen K_m -Werte beider H-Proteine waren jedoch nahezu identisch. Im Vergleich mit dem *Synechocystis* H-Protein waren die K_m -Werte der *Flaveria* H-Proteine dagegen um den Faktor 100 erhöht (Tabelle 32). Zur Kontrolle wurde das *Synechocystis* H-Protein erneut mit dem optimiert aufgereinigten *Synechocystis* P-Protein vermessen. Die nun ermittelten Enzymaktivitäten waren im Vergleich zu früheren Messungen aus Punkt 5.2.1 um den Faktor 70 höher (Tabelle 32). Im Gegensatz dazu blieb der K_m des *Synechocystis* H-Proteins nahezu identisch.

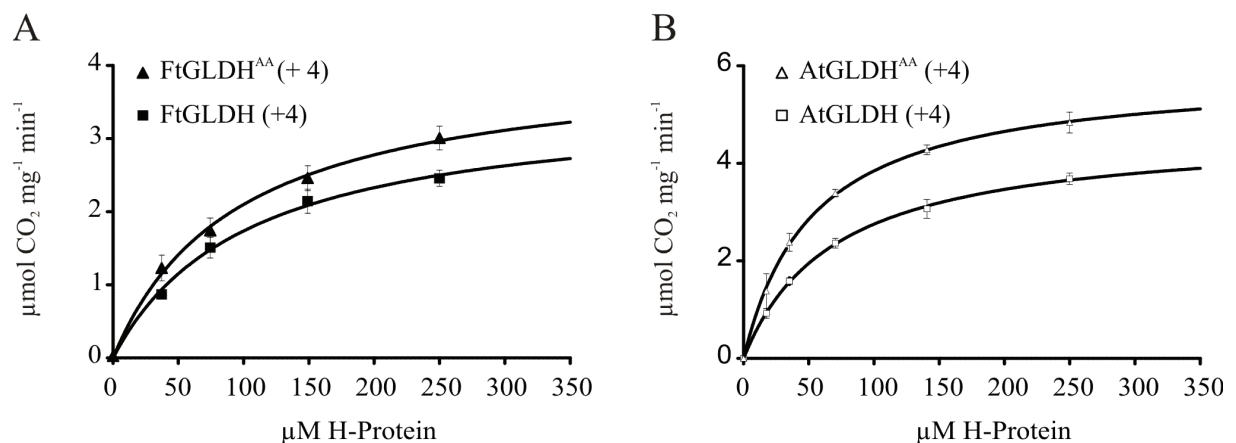


Abb. 39: Messungen der P-Protein-Aktivität in Abhängigkeit von pflanzlichen H-Proteinen als Co-Substrat. A: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,4 µM dimeres P-Protein) in Abhängigkeit von den H-Proteinen FtGLDH (Viereck) und FtGLDH^{AA} (Dreieck) von *F. trinervia* B: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,4 µM dimeres P-Protein) in Abhängigkeit vom H-Protein1 aus *A. thaliana* (Viereck, AtGLDH1) sowie dem durch gentechnische Methoden veränderten H-Protein1 (AtGLDH1^{AA}). Der His-Tag der H-Proteine wurde mittels Thrombin-Behandlung entfernt.

Mit diesen biochemischen Analysen wurde eine Verbesserung der P-Protein-Aktivität durch die Insertion von zwei Alanin-Molekülen am N-Terminus von FtGLDH^{AA} gezeigt. Zur Verifikation wurden in AtGLDH1 ebenfalls zwei Alanin-Moleküle durch gentechnische Methoden inseriert (Abb. 38, AtGLDH1^{AA}). Das H-Protein AtGLDH1 sowie das nach dem Vorbild von FtGLDH^{AA} veränderte Protein AtGLDH^{AA} wurden anschließend als Co-Substrate zu dem *Synechocystis* P-Protein gegeben und die biochemischen Parameter bestimmt (Abb. 39B). Mit dem H-Protein AtGLDH1^{AA} ($V_{\max} = 5,9 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) wurden deutlich höhere Enzymaktivitäten als mit AtGLDH1 ($V_{\max} = 4,7 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) gemessen. Die ermittelten K_m -Werte der beiden *Arabidopsis* H-Proteine waren mit $70 \mu\text{M}$ (AtGLDH1) bzw. $55 \mu\text{M}$ (AtGLDH1^{AA}) wiederum sehr ähnlich und etwa um 50 % geringer als die K_m -Werte der *Flaveria* H-Proteine (Tabelle 32).

Tabelle 32: Kinetische Parameter des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins mit pflanzlichen H-Proteinen als Co-Substrat. Es wurden H-Proteine verwendet, deren His-Tag durch Thrombin-Behandlung nahezu vollständig entfernt war (+4). Diese Proteine haben gegenüber den nativen Proteinen einen N-terminalen Überhang von 4 AS. Um einen Einfluss dieser AS auszuschließen, wurden zusätzlich H-Proteine ohne Affinitätstag heterolog exprimiert und ebenfalls getestet.

H-Protein	K_m (H-Protein) (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
<i>Synechocystis</i> (+4)	1,6 ± 0,1	5,5 ± 0,12
FtGLDH (+4)	103 ± 12	3,5 ± 0,17
FtGLDH ^{AA} (+4)	95 ± 12	4,1 ± 0,21
AtGLDH1 (+4)	70 ± 4,2	4,7 ± 0,10
AtGLDH1 ^{AA} (+4)	53 ± 3,9	5,9 ± 0,15
FtGLDH	128 ± 8,7	3,8 ± 0,16
FtGLDH ^{AA}	109 ± 9,1	4,4 ± 0,15
AtGLDH1	51 ± 4,8	4,9 ± 0,16
AtGLDH1 ^{AA}	60 ± 2,2	5,8 ± 0,07

Die mit AtGLDH1^{AA} durchgeführten Experimente erhärten die Annahme, dass die Insertion der Alanin-Moleküle zu einer Verbesserung der Eigenschaften als Co-Substrat führt. Um hier einen artifiziellen Effekt des Mischsystems aus prokaryotischem P-Protein und eukaryotischen H-Proteinen auszuschließen, wurden diese Experimente nochmals mit einem eukaryotischen P-Protein verifiziert. Da es bis heute nicht gelang, ein biochemisch aktives eukaryotisches P-Protein heterolog zu exprimieren, wurden Mitochondrienextrakte aus Erbse verwendet. GCS aus der mitochondrialen Matrix von *Pisum sativum* wurde bereits sehr gut biochemisch charakterisiert (Bourguignon *et al.*, 1988, Rebeille *et al.*, 1994, Walker & Oliver, 1986). Darüber hinaus war die Isolierung der Mitochondrien aus den Blattgeweben von Erbse relativ einfach durchzuführen. Die aus *P. sativum* geernteten Mitochondrien wurden schonend

lysiert und mit Tris/HCl-Puffer verdünnt. Durch diesen Schritt dissoziieren die GCS-Komponenten voneinander (Walker & Oliver, 1986). Das Lysat wurde anschließend über Ultrafiltration konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

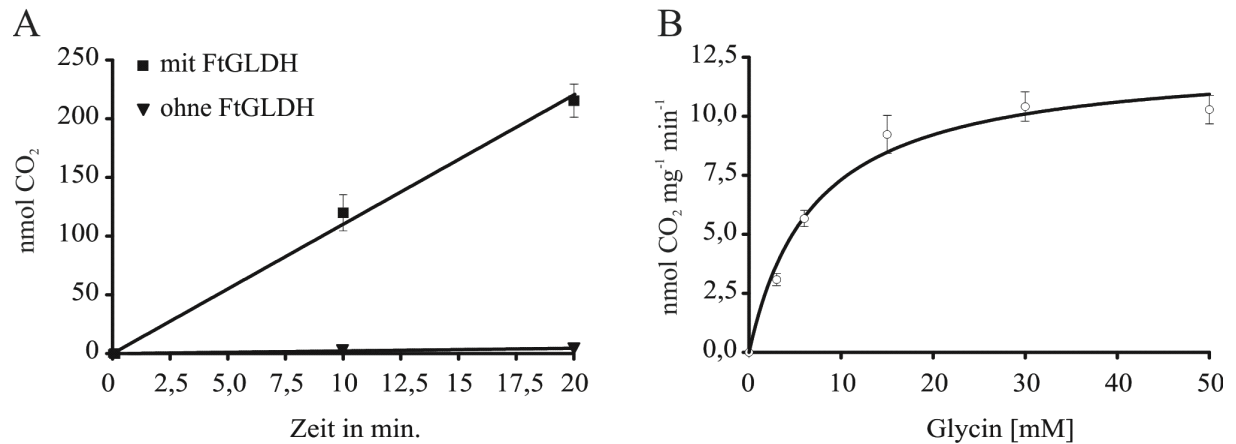


Abb. 40: Kinetische Parameter des P-Proteins aus einem *P. sativum* Matrixextrakt in Abhängigkeit von der Zeit (A) und Glycin (B). A: Messung der Enzymaktivität des P-Proteins aus *P. sativum* Mitochondrienextrakt über einem Zeitraum von 20 min ohne Zugabe von externem H-Protein (Dreieck) bzw. nach Zugabe von 50 µM FtGLDH. B: Abhängigkeit der P-Protein-Aktivität des *P. sativum* Mitochondrienextrakts von Glycin in Gegenwart von FtGLDH.

In den anschließend durchgeführten Experimenten wurde die Aktivität des Erbsen-P-Proteins bestimmt. Ohne Zugabe von externem H-Protein war die gemessene Enzymaktivität sehr gering ($V_{\max} = 0,2 \text{ nmol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Jedoch war es möglich, die Enzymaktivität durch Zugabe von pflanzlichem H-Protein um den Faktor 60 zu erhöhen (Abb. 40A). Dieses Ergebnis zeigt deutlich die H-Protein-Limitierung im verwendeten Matrixextrakt. Durch diese Tatsache war es anschließend möglich, die biochemischen Parameter eines pflanzlichen P-Proteins in Abhängigkeit von pflanzlichen H-Proteinen zu bestimmen. Die gemessenen Enzymaktivitäten waren über einen Zeitraum von 20 min linear. Der bestimmte K_m -Wert für Glycin lag bei 7 mM (Abb. 40B) und entsprach damit bereits publizierten Daten von eukaryotischen P-Proteinen (Hiraga & Kikuchi, 1980, Sarojini & Oliver, 1983).

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Abhängigkeit des Erbsen-P-Proteins von den H-Proteinen aus *F. trinervia* und *A. thaliana* bestimmt, die vorher bereits mit dem *Synechocystis* P-Protein vermessen worden waren. Wie bei der Verwendung des *Synechocystis* P-Proteins wurde auch mit dem pflanzlichen P-Protein festgestellt, dass mit FtGLDH^{AA} ($V_{\max} = 11,2 \text{ nmol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) als Co-Substrat eine höhere Enzymaktivität als mit FtGLDH ($9,4 \text{ nmol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) erreicht wurde (Abb. 41A, Tabelle 33). Die mit AtGLDH1^{AA} ($V_{\max} = 12,2 \text{ nmol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) gemessenen Enzymaktivitäten waren im Vergleich zu AtGLDH1 ebenfalls größer (Abb. 41B, Tabelle 33). Die gemessenen K_m -Werte für die pflanzlichen H-Proteine waren in Kombination mit dem pflanzlichen P-Protein deutlich geringer als mit dem cyanobakteriellen Enzym (Tabelle 33).

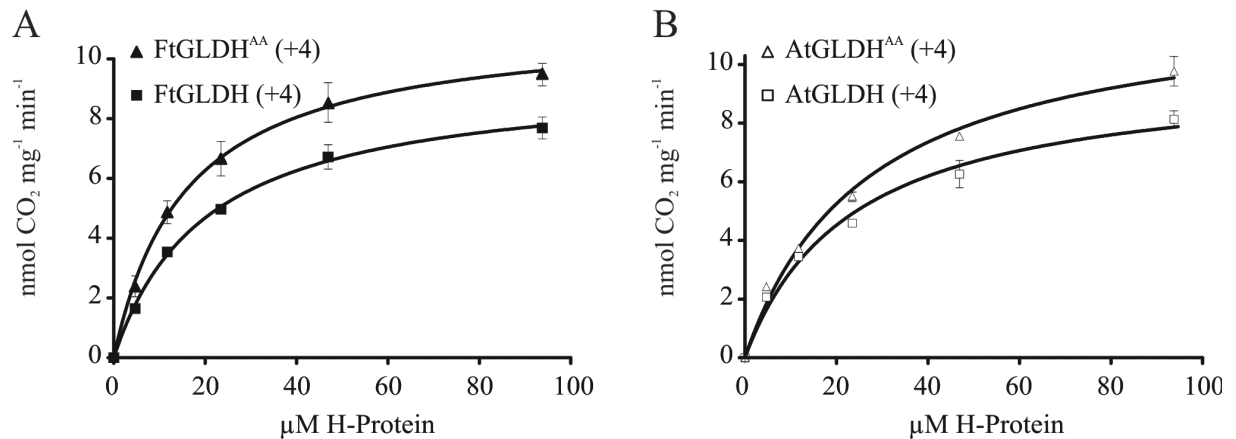


Abb. 41: Aktivität des P-Proteins aus *P. sativum* in Abhängigkeit von pflanzlichen H-Proteinen als Co-Substrat. A: Aktivität in Abhängigkeit von den *F. trinervia* H-Proteinen FtGLDH (Viereck, schwarz) und FtGLDH^{AA} (Dreieck, schwarz). B: Aktivität in Abhängigkeit von AtGLDH1 aus *A. thaliana* (Viereck, weiß) und AtGLDH1^{AA} (Dreieck, weiß). Der His-Tag der H-Proteine wurde mittels Thrombin-Behandlung entfernt.

Tabelle 33: Kinetische Parameter des P-Proteins aus dem *P. sativum* Mitochondrienextrakt in Abhängigkeit von pflanzlichen H-Proteinen als Co-Substrat. Es wurden H-Proteine verwendet, deren His-Tag durch Thrombin-Behandlung nahezu vollständig entfernt wurde (+4).

H-Protein	K _m (H-Protein) (µM)	V _{max} (µmol CO ₂ g ⁻¹ s ⁻¹)
FtGLDH (+4)	20,4 ± 2,1	9,4 ± 0,3
FtGLDH ^{AA} (+4)	15,9 ± 1,6	11,2 ± 0,4
AtGLDH1 (+4)	23,5 ± 3,1	9,8 ± 0,5
AtGLDH1 ^{AA} (+4)	26,7 ± 3,0	12,2 ± 0,6
ohne H-Protein-Zusatz	nicht appliziert	0,2 ± 0,03

Alle bisherigen Ergebnisse ergaben, dass FtGLDH^{AA} in Kombination mit einem pro- oder eukaryotischem P-Protein ein besseres Co-Substrat als FtGLDH darstellt. Diese Ergebnisse wurden mit dem artifiziellen H-Protein AtGLDH^{AA} aus *A. thaliana* verifiziert. Jedoch enthielten die mit Thrombin behandelten H-Proteine einen artifiziellen Überhang von vier Aminosäuren (Gly-Ser-His-Met), welcher sich in einem Abstand von nur zwei Aminosäuren von der Alanin-Insertion befand. Deshalb konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der übrig gebliebene Teil des Affinitätstags einen Einfluss auf die P-Protein-Aktivität ausübt. Um dies auszuschließen, wurden die pflanzlichen H-Proteine aus *F. trinervia* und *A. thaliana* in einem finalen Experiment ohne Affinitätstag exprimiert. Nach deren Aufreinigung wurden die biochemischen Parameter dieser H-Proteine mit dem *Synechocystis* P-Protein bestimmt (Abb. 42, Tabelle 32). Bei der Gegenüberstellung der biochemischen Parameter dieser H-Proteine stellte sich heraus, dass auch H-Proteine ohne Affinitätstag die zuvor beobachteten Ergebnisse lieferten. Wiederum wurden mit den H-Proteinen, welche über die Alanin-Insertion verfügten, größere Enzymaktivitäten gemessen.

Die in dieser Dissertation erzielten biochemischen Daten beweisen die Synthese eines durch alternatives Spleißen verbesserten H-Proteins in den grünen Organen der C_4 -Pflanze *F. trinervia*. Dieses Ergebnis konnte sowohl mit pro- als auch mit eukaryotischem P-Protein erzielt werden. Mit dem artifiziell nach dem Vorbild von FtGLDH^{AA} hergestelltem H-Protein aus *A. thaliana* (AtGLDH1^{AA}) wurden ebenfalls höhere Enzymaktivitäten gemessen.

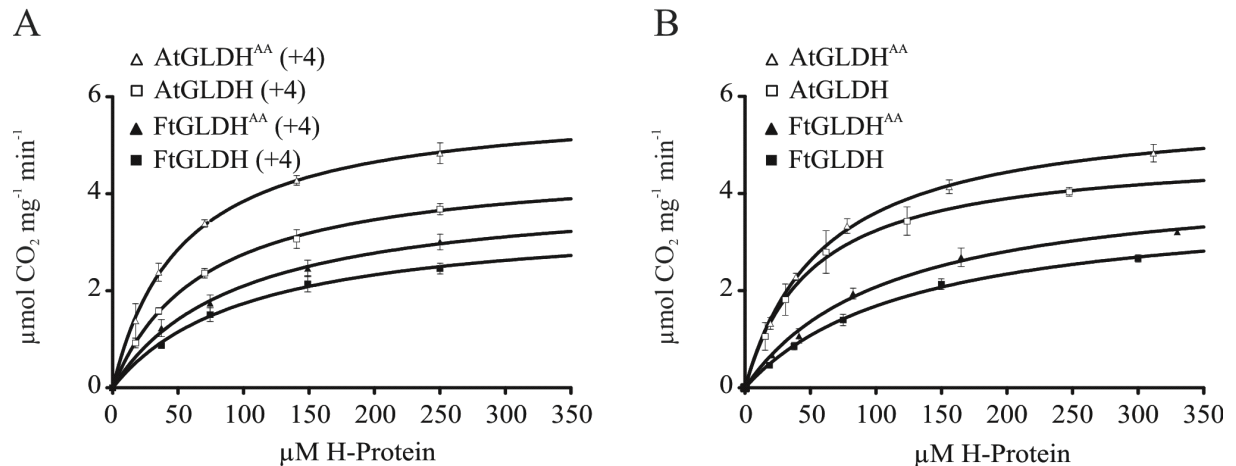


Abb. 42: Messungen der *Synechocystis* P-Protein-Aktivität in Abhängigkeit von pflanzlichen H-Proteinen als Co-Substrat. A: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,4 µM dimeres P-Protein) in Abhängigkeit von den pflanzlichen H-Proteinen FtGLDH (Viereck, schwarz), FtGLDH^{AA} (Dreieck, schwarz), AtGLDH (Viereck, weiß) und AtGLDH^{AA} (Dreieck, weiß). Der Affinitätstag wurde durch eine Thrombin-Behandlung entfernt (+4). B: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,4 µM dimeres P-Protein) in Abhängigkeit von den pflanzlichen H-Proteinen FtGLDH (Viereck, schwarz), FtGLDH^{AA} (Dreieck, schwarz), AtGLDH (Viereck, weiß) und AtGLDH^{AA} (Dreieck, weiß), die ohne Affinitätstag vorlagen.

5.2.2.2. Untersuchung der prokaryotischen H-Proteine aus *T. elongatus* und *E. coli* sowie des H-Proteins aus *H. sapiens*

Die im Punkt 5.2.2.1 durchgeführten Experimente bestätigten die Eignung des cyanobakteriellen P-Proteins für die Charakterisierung pflanzlicher H-Proteine. Des Weiteren wurden die Substrateigenschaften der H-Proteine aus *T. elongatus*, *E. coli* und *H. sapiens* überprüft. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob auch weitere pro- und eukaryotische H-Proteine als Substrat für das prokaryotische P-Protein dienen können. Dies würde die Hypothese erhärten, dass sich das *Synechocystis* P-Protein als Modellprotein zur Charakterisierung homodimerer P-Proteine im Allgemeinen eignet und eine dreidimensionale Proteinstruktur dieses Enzyms wichtige Erkenntnisse über die Funktionsweise dieser Enzyme ermöglicht.

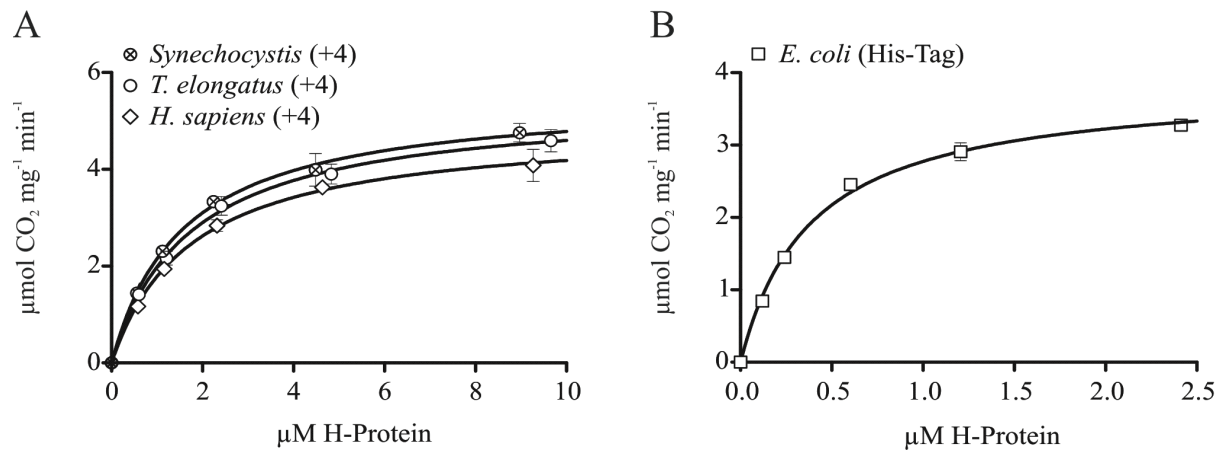


Abb. 43: Messungen der P-Protein-Aktivität in Abhängigkeit von H-Proteinen aus *Synechocystis*, *T. elongatus*, *E. coli* und *H. sapiens*. A: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,4 µM dimeres P-Protein) in Abhängigkeit von den H-Proteinen aus *Synechocystis* (Kreis mit Kreuz), *T. elongatus* (Kreis) und *H. sapiens* (Karo). Der Affinitätstag wurde mit Thrombin entfernt (+4). B: Aktivität des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins (0,4 µM dimeres P-Protein) in Abhängigkeit vom H-Protein aus *E. coli* (Vierteck) mit His-Tag-Fusion.

Die zur Untersuchung verwendeten H-Proteine aus *T. elongatus* und *H. sapiens* wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert, der nach der Reinigung durch eine Thrombin-Behandlung entfernt wurde. Beim H-Protein aus *E. coli* konnte die Proteinfusion nicht entfernt werden. Als Referenzprotein wurde das bereits analysierte H-Protein aus *Synechocystis* mitgeführt. Bei dem Vergleich der biochemischen Parameter der H-Proteine aus *Synechocystis*, *T. elongatus* und *H. sapiens* ist erkennbar, dass die berechneten V_{\max} -Werte des cyanobakteriellen P-Proteins sowie die K_m -Werte der jeweiligen H-Proteine nahezu identisch waren (Abb. 43A, Tabelle 34). Ähnliche V_{\max} -Werte wurden bereits mit den pflanzlichen H-Proteinen erreicht. Die zuvor ermittelten K_m -Werte der pflanzlichen H-Proteine waren im Vergleich zu den bakteriellen H-Proteinen allerdings deutlich größer. Das H-Protein aus *H. sapiens* besaß als einziges untersuchtes eukaryotisches H-Protein einen K_m -Wert, der identisch zu denen der prokaryotischen H-Proteine war (Abb. 43A, Tabelle 34). Die biochemischen Eigenschaften des *E. coli* H-Proteins wichen etwas von denen der H-Proteine aus *Synechocystis*, *T. elongatus* und *H. sapiens* ab. Der ermittelte V_{\max} -Wert des H-Proteins aus *E. coli* war etwas geringer als die Werte der bereits untersuchten pro- und eukaryotischen H-Proteine. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der fusionierte His-Tag sein, der auch die Substrateigenschaften anderer H-Proteine negativ beeinflusste (5.2.1).

Tabelle 34: Kinetische Parameter des rekombinanten *Synechocystis* P-Proteins mit pro- und eukaryotischen H-Proteinen als Co-Substrat. Es wurden H-Proteine verwendet, deren His-Tag durch Thrombin-Behandlung nahezu vollständig entfernt wurde (+4). Der His-Tag des *E. coli* H-Proteins konnte nicht entfernt werden. Es wurde deshalb als Fusionsprotein eingesetzt.

H-Protein	K_m (H-Protein) (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
<i>Synechocystis</i> (+4)	1,57 \pm 0,10	5,53 \pm 0,12
<i>H. sapiens</i> (+4)	1,75 \pm 0,12	4,92 \pm 0,12
<i>T. elongatus</i> (+4)	1,72 \pm 0,11	5,39 \pm 0,12
<i>E. coli</i> His-Tag	0,40 \pm 0,02	3,84 \pm 0,06

5.3. Kristallisation von GCS-Proteinen

Neben der biochemischen Charakterisierung des P-Proteins aus *Synechocystis* war dessen Kristallisierung der zweite Hauptschwerpunkt dieser Dissertation. Abgesehen von den Arbeiten mit dem P-Protein aus *Synechocystis* wurde zusätzlich die Kristallisation des *Synechocystis* L-Proteins versucht. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, erfolgreich Proteinkristalle für eine Röntgenstrukturanalyse zu erhalten.

Die moderne Röntgenkristallografie ermöglicht einen Einblick in die dreidimensionale Struktur von Proteinen. Sie gibt Anhaltspunkte auf die Funktionsweise von Proteinen und ermöglicht damit sogar die Synthese neuer Therapeutika zur Behandlung schwerwiegender Krankheiten. Der limitierende Schritt dieser Methode ist jedoch die Erzeugung von Proteinkristallen. Der Prozess des Findens geeigneter Bedingungen zur Kristallisation eines spezifischen Proteins kann sehr langwierig sein und beinhaltet die Überprüfung vieler verschiedener Bedingungen. Die Bildung von Kristallen kann in zwei Phasen unterteilt werden, die Nukleation und das Wachstum der Kristalle aus den Nuklei (Chayen, 2005). Bei der Kristallisation scheidet sich ein Stoff (hier Protein) nach initialer Keimbildung aus einer übersättigten Lösung so lange aus, bis das thermodynamische Löslichkeitsprodukt erreicht ist. Die Schwierigkeit besteht bei Proteinen allerdings darin, diesen Abscheidungsprozess so zu kontrollieren, dass das Protein nicht als Präzipitat ausfällt, sondern seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften entsprechend, geordnete, periodische Strukturen ausbildet, also kristallisiert.

Die Abb. 44 zeigt das Phasendiagramm einer Proteinlösung. Die Information über das Verhalten einer spezifischen Proteinlösung im Phasendiagramm minimiert die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen. Es gibt mehrere Parameter, welche die Kristallisation eines Proteins beeinflussen. Dies sind unter anderem die Konzentration des Proteins, der pH-Wert und der umgebende Puffer (Ionenstärke). Entscheidend für die Anzahl und Größe der Kristalle (zumeist reziprokes Verhältnis) ist die Kristallisationskeimbildungsrate im Ansatz und die Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle. In der Praxis wird oft eine hoch

konzentrierte oder übersättigte Proteinlösung mit einem Präzipitant versetzt. Dies erfolgte während dieser Dissertation mit der Dampfdiffusionsmethode.

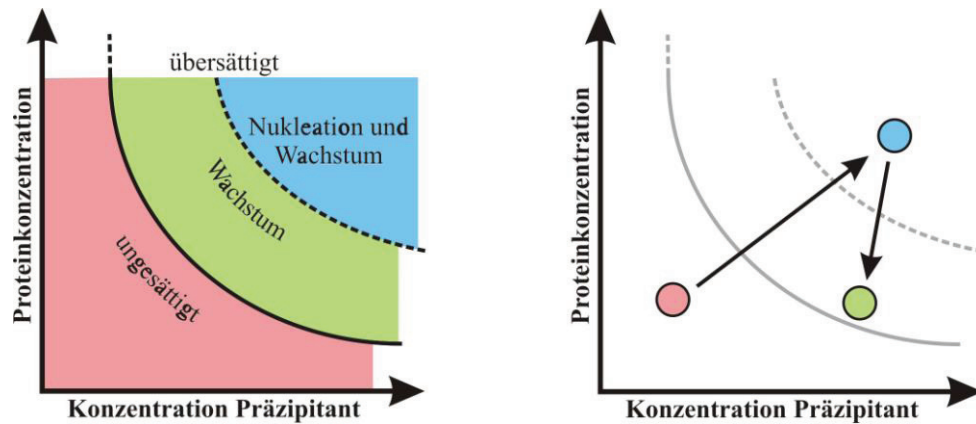


Abb. 44: Beispiel eines Phasendiagramms einer Proteinlösung. Aufgetragen ist die Proteinkonzentration gegen die Konzentration des Fällungsmittels. Links: Die Löslichkeitskurve (grün) trennt das Diagramm in die ungesättigte und die übersättigte Zone. Die übersättigte Zone wiederum wird getrennt durch die Nukleations- und Wachstumszone. Rechts: Während eines erfolgreichen Dampfdiffusionsexperiments durchschreitet die Proteinlösung drei Zonen. Die Lösung geht durch Erhöhung der Präzipitant- und Proteinkonzentration von der ungesättigten Phase in die Nukleationsphase über. Dadurch verringert sich die Proteinkonzentration in der löslichen Phase und die Lösung geht in die Wachstumsphase über, in der Kristalle ohne die Bildung neuer Nuklei wachsen.

5.3.1. Kristallisation des P-Proteins aus *Synechocystis*

5.3.1.1. Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen

Nach der Etablierung und Optimierung einer Reinigungsmethode für das *Synechocystis* P-Protein wurden Kristallisationskits genutzt, um nach geeigneten Kristallisationsbedingungen zu suchen. Die Bildung erster Mikrokristalle wurde mit dem PEG/IonTM-Screen bei 20 °C innerhalb von 2-5 Tagen beobachtet (Abb. 45). Es war bereits deutlich erkennbar, dass die Tropfen des Reservoir-Protein-Gemisches mit einer Proteinhaut überzogen waren (Abb. 45B). Viele der P-Protein-Mikrokristalle, das traf auch auf die später synthetisierten dreidimensionalen P-Protein-Kristalle zu, wuchsen von dieser ausgehend in den Tropfen hinein. Die mit den kommerziell erhältlichen Kits erhaltene Kristallqualität reichte für die Aufnahme eines röntgenkristallografischen Datensatzes nicht aus. Die Mikrokristalle waren sehr klein, dünn und damit außerordentlich zerbrechlich. Die Synthese der ersten zweidimensionalen Kristalle (Abb. 45C) deutete an, dass die Erzeugung qualitativ hochwertiger, für die Röntgenkristallografie nutzbarer Kristalle möglich war.

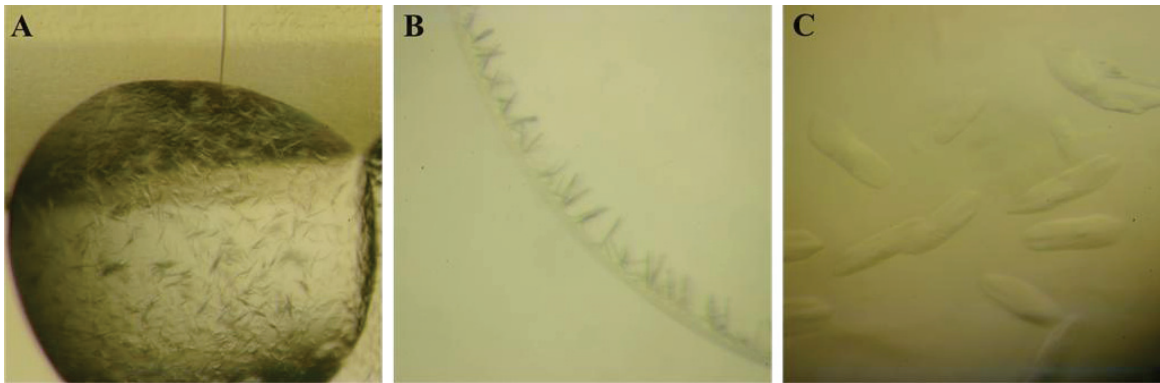


Abb. 45: Mikroskopische Aufnahmen von P-Protein-Mikrokristallen. A: Diese Kristalle wurden mit der Pufferlösung G10 (0,1 M Natrium-Format pH 7, 12 % w/v PEG 3350) des PEG/IonTM-Screen (Hampton Research) erhalten. B: Diese Kristalle wurden mit der Pufferlösung A4 (0,3 M Lithiumchlorid, 20 % w/v PEG 3350) des PEG/IonTM-Screen (Hampton Research) synthetisiert. C: Diese Kristalle wurden mit der Pufferlösung H9 (0,1 M HEPES pH 7,0; 0,15 M CsCl, 15 % w/v PEG 3350) des PEG/IonTM-Screen (Hampton Research) synthetisiert.

5.3.1.2. Untersuchung der prokaryotischen H-Proteine aus *T. elongatus* und *E. coli* sowie des H-Proteins aus *H. sapiens*

Die in Abb. 45 (C) verwendeten Kristallisationsbedingungen wurden als Basis für weitere Experimente genutzt. Davon ausgehend wurden Optimierungsexperimente durchgeführt, die identisch zu den Experimenten mit dem *Synechocystis* L-Protein waren. Durch die Variation des pH-Werts, der PEG-Konzentration und der Cesiumchlorid-Konzentration gelang die Erzeugung erster dreidimensionaler P-Protein-Kristalle (Abb. 46).

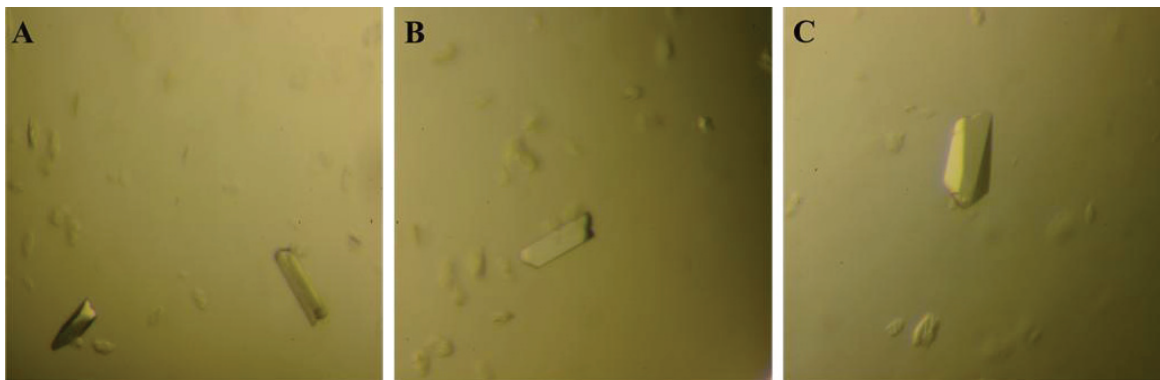


Abb. 46: Mikroskopische Aufnahmen erster dreidimensionaler P-Protein-Kristalle nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen. Die Kristalle konnten mit folgender Reservoirolösung im *hanging-drop*-Verfahren erhalten werden: 0,1 M Tris/HCl pH 8, 15 % w/v PEG 3350, 0,2 M CsCl.

Der entscheidende Schritt für den Erhalt der dreidimensionalen Kristalle war die Anhebung des pH-Werts auf 8. Die unter diesen Bedingungen vergrößerte Löslichkeit des P-Proteins erforderte eine Erhöhung der Proteinkonzentration von 10 mg/ml auf 40 mg/ml. Nachfolgende Versuche, ähnliche Kristalle unter identischen Bedingungen zu erhalten,

schlugen fehl. Deshalb wurde die Synthese weiterer Kristalle ausgehend von den Bedingungen aus Abb. 46 durch *streak seeding* versucht.

Der entscheidende Schritt für den Erhalt der dreidimensionalen Kristalle war die Anhebung des pH-Werts auf 8. Die unter diesen Bedingungen vergrößerte Löslichkeit des P-Proteins erforderte eine Erhöhung der Proteinkonzentration von 10 mg/ml auf 40 mg/ml. Nachfolgende Versuche, ähnliche Kristalle unter identischen Bedingungen zu erhalten, schlugen fehl. Deshalb wurde die Synthese weiterer Kristalle ausgehend von den Bedingungen aus Abb. 46 durch *streak seeding* versucht.

5.3.1.3. Erzeugung von P-Protein-Kristallen durch *streak seeding*

Für die Durchführung wurde ein P-Protein-Kristall aus Abb. 46 mechanisch zerstört. Die daraus erhaltenen *microseeds* wurden anschließend für die Synthese neuer P-Protein-Kristalle genutzt. Normalerweise werden die *microseeds* nach einer Inkubationszeit von 12-24 h nach Mischung des Tropfens (Reservoir + Proteinlösung) in die Lösung appliziert. Jedoch bildete sich schon kurz nach dem Ansatz des Tropfens eine Proteinhaut. Aufgrund dessen wurde das *streak seeding* bereits 1-2 h nach der Mischung des Tropfens durchgeführt. Die Proteinhaut war zu diesem Zeitpunkt zwar bereits vorhanden, jedoch noch nicht stabil. Eine Beimischung des Tropfens zu einem späteren Zeitpunkt führte häufig zur Zerstörung des Tropfens. Die Abb. 47 dokumentiert das Ergebnis eines *streak-seeding*-Experiments mit dem *Synechocystis* P-Protein. Es ist deutlich sichtbar wie entlang der Linie, in der das Haar durch den Tropfen gezogen wurde, neue Kristalle entstanden. Die Verwendung dieser Methode erlaubte es, viele Kristalle für röntgenkristallografische Beugungsexperimente zu erhalten.

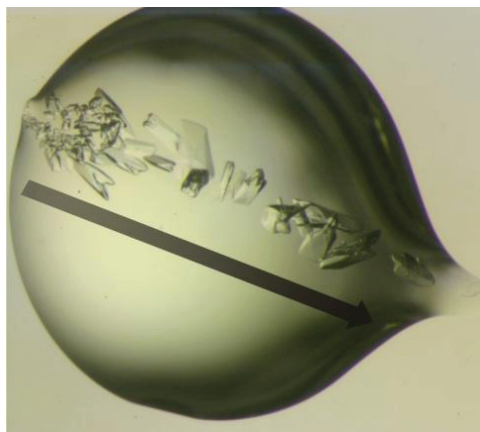


Abb. 47: Mikroskopische Aufnahmen von P-Protein-Kristallen nach einem *streak-seeding*-Experiment. Das Haar mit den Mikrokristallen wurde von links nach recht (Pfeil) durch den Tropfen gezogen.

5.3.1.4. Erzeugung von P-Protein-Kristallen für X-Ray-Beugungsexperimente

Zur Gewinnung von Beugungsdaten wurden Kristalle des P-Apoproteins sowie des PLP-komplexierten P-Proteins erzeugt. Alle bisher untersuchten P-Proteine binden die prosthetische Gruppe PLP kovalent an einem konservierten Lysinrest im aktiven Zentrum des Enzyms (Nakai *et al.*, 2005). Während des voranschreitenden Reinigungsprozesses verlor das *Synechocystis* P-Protein seine gelbliche Färbung vollständig. Dieser Vorgang deutete den Verlust des gebundenen PLP-Moleküls an. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Proteinisolaten um P-Apoenzym handelt.

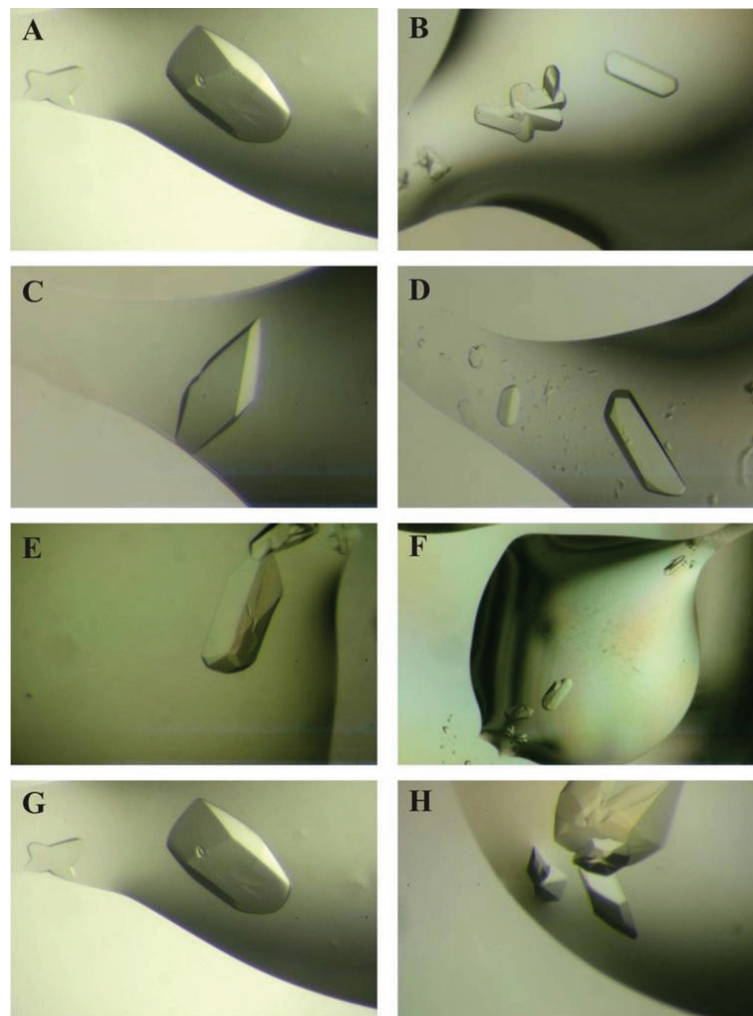


Abb. 48: Mikroskopische Aufnahmen von P-Protein-Kristallen. Die Aufnahmen zeigen P-Apoprotein-Kristalle (A-B). Weitere Kristalle wurden durch Zusatz des Inhibitors O-(Carboxymethyl)hydroxylamin hemihydrochlorid (C-D), 200 μ M PLP (E-F) oder Inhibitor und PLP (G-H) erzeugt.

Neben der Kristallisierung von P-Apoenzym (Abb. 48, A-B) wurde auch versucht, Kristalle von P-Protein im Komplex mit einem Inhibitor zu kristallisieren. In der Literatur ist erwähnt, das O- (Carboxymethyl)hydroxylamin-hemihydrochlorid ein sehr effektiver Inhibitor des P-Proteins ist, der im aktiven Zentrum binden soll (Sarojini & Oliver, 1985). Dieser Inhibitor wurde in einer Konzentration von 1 mM zu dem P-Apoprotein gegeben, welches anschließend

sofort für Kristallisationsexperimente verwendet wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Kristalle wurden als Inhibitor-kristalle bezeichnet (Abb. 48, C-D). Des Weiteren wurde versucht, P-Protein in Komplex mit PLP zu kristallisieren. Hierzu wurde das P-Apoprotein 30 min mit 200 μ M PLP auf Eis inkubiert. Danach wurde die gelbliche Proteinlösung für Kristallisationsexperimente eingesetzt und die Kristalle aus Abb. 48 (E-F) erhalten. Während dieser Experimente fiel auf, dass in Gegenwart von PLP deutlich weniger Kristalle erhalten wurden als mit dem P-Apo- oder Inhibitorprotein. Die PLP-Kristalle waren außerdem kleiner und das äußere Erscheinungsbild runder. Durch die PLP-Bindung an das aktive Zentrum wurde eine starke gelbliche Färbung der Kristalle erwartet. Es war jedoch kein Unterschied zwischen den PLP-Kristallen und der gelben Färbung der umgebenden Reservoir-Proteinlösung erkennbar. In weiteren Experimenten wurde P-Protein gleichzeitig mit PLP sowie Inhibitor inkubiert und anschließend kristallisiert (Abb. 48, G-H). Nach Zugabe des Inhibitors entfärbte sich die gelbe Proteinlösung. Dies könnte auf eine Bindung des O-(Carboxymethyl)hydroxylamin-hemihydrochlorids an das sich im aktiven Zentrum befindliche PLP-Molekül oder dessen Verdrängung hinweisen.

5.3.1.5. Aufnahme kristallografischer Datensätze von P-Protein-Kristallen

Die erhaltenen Kristalle des P-Apoproteins sowie die Komplexkristalle wurden anschließend mit Synchrotronstrahlung am ESRF in Grenoble (Frankreich) unter kryokristallografischen Bedingungen untersucht. Die gemessenen Beugungsdaten der Kristalle wurden bei einer Temperatur von 100 K ermittelt. Dies hat den Vorteil, dass der Zerfall, der nach der Bestrahlung des Kristalls mit Synchrotronstrahlung beginnt, nicht so schnell voranschreitet wie bei Raumtemperatur (Haas & Rossmann, 1970, Low *et al.*, 1966).

Zur Durchführung der kryokristallografischen Analysen wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um das Protein zu schützen, wurden die Kristalle zuvor in einer kryoprotektiven Lösung inkubiert, die der jeweiligen Reservoir-Lösung unter Zusatz von 20 % Ethylenglykol bzw. Glycerol entsprach. Die Beugungsdaten wurden in Beamline ID14-4 mit einem CCD-Detektor (ADSCQ315r) gemessen. Die verwendete Synchrotronstrahlung hatte eine Wellenlänge von 0,98 Å und der Speicherring wurde im 16-bunch-mode betrieben. Die Stabilität der P-Protein-Kristalle war ausreichend, um jeweils einen oder zwei Datensätze von einem einzigen Kristall zu erhalten. Insgesamt wurden Datensätze von 9 Kristallen aufgenommen (siehe 9.4.5, Tabelle 39). Soweit möglich, wurde versucht, einen *high-resolution*-Datensatz sowie einen *low-resolution*-Datensatz zu erfassen.

5.3.1.6. Erste kristallografische Charakterisierung eines P-Apoprotein-Kristalls

Die Qualität der Datensätze der P-Apoprotein-Kristalle war deutlich besser als die der Komplex-Kristalle. Der beste Apoprotein-Kristall streute die Synchrotronstrahlung bis zu 2,1 Ångström (Abb. 49).

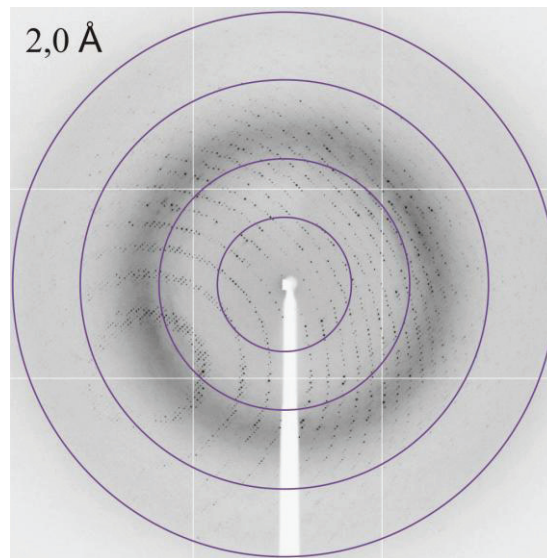


Abb. 49: Beugungsmuster der Synchrotronstrahlung am P-Apoprotein-Kristall 33. Das Beugungsmuster wurde aufgenommen in ID14-4 am ESRF (Grenoble, Frankreich). Die Oszillation betrug 0,5°.

Die erhaltenen Daten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK ausgewertet (Otwinowski & Minor, 1997). Die untersuchten Apoprotein-Kristalle gehörten zu einem orthorhombischen System mit der Raumgruppe P222 und es wurden folgende Gitterkonstanten ermittelt:

$$a = 96 \text{ Å}, b = 136 \text{ Å}, c = 179 \text{ Å}$$

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

Der Apoprotein-Kristall 33 lieferte den besten Datensatz. Eine statistische Analyse der von diesem Kristall erhaltenen Daten sowie seiner *unit cell* befindet sich in der Tabelle 35. Durch die Analyse der systematisch fehlenden Reflexe konnte auf das Vorliegen einer Raumgruppe mit mehreren Schraubachsen geschlossen werden. Die nach den erhaltenen Daten wahrscheinlichste Raumgruppe war $P2_12_12_1$. Nach der Berechnung des Matthews-Koeffizienten befindet sich ein P-Protein-Homodimer in einer asymmetrischen Einheit (Matthews, 1968). Zugrunde gelegt für die Berechnungen wurde die Masse von 215 kD für das homodimere *Synechocystis* P-Protein.

Tabelle 35: Statistiken der Datensammlung (Hasse *et al.*, 2010)

Die Nummern in den Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

	Natives P-Protein
Wellenlänge (Å)	0.9795
<i>beamline</i>	ID14-4, ESRF
Auflösung (Å)	50-2.1 (2.18-2.10)
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Parameter der Elementarzelle	
a (Å)	96.30
b (Å)	135.81
c (Å)	179.08
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
beobachtete Reflexe	3 046 777
Zahl der unabhängigen Reflexe	136 942
Mosaizität (°)	0.44
Redundanz	7.4 (7.5)
Vollständigkeit (%)	99.8 (100)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0.078 (0.353)
durchschnittliche $I/\sigma(I)$	29.90 (4.49)

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$, dabei ist $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität der Symmetrie-äquivalenten Reflexe.

5.3.1.7. Kristallisation des Selenomethionin-markiertem P-Proteins aus *Synechocystis*

Substitutionsderivate eines Kristalls werden benötigt, um das Phasenproblem während der Strukturbestimmung zu lösen. Im Falle des *Synechocystis* P-Proteins stand zwar die homologe Struktur des *T. thermophilus* Enzyms für ein *molecular replacement* zur Verfügung, allerdings können Streuungsdaten von Substitutionsproteinen helfen ein späteres Strukturmodell, dass mit *molecular replacement* erhalten wurde, zu verifizieren. Dabei wird die Methode des "isomorphen Ersatzes" angewendet.

Nach der Expression und Reinigung des Selenomethionin-markierten P-Proteins (5.1.2.3) wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Leider weichen die Kristallisationsbedingungen der Substitutionsproteine häufig von denen der nativen Proteine ab. Dies machte die Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen erforderlich. Kristalle des Substitutionsproteins wurden durch die Absenkung des pH-Werts (pH 7) erhalten (Abb. 50). Im Vergleich zu den Proteinen ohne Selenomethionin wuchsen diese jedoch langsamer und hatten eine sehr geringe Größe.

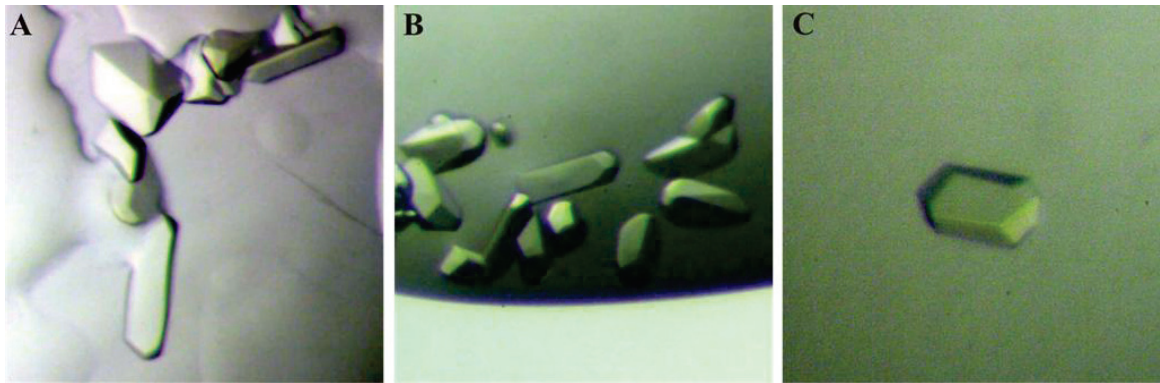


Abb. 50: Mikroskopische Aufnahmen von Kristallen mit Selenomethionin-markiertem P-Protein. Die Kristalle konnten mit folgender Reservoir-Lösung im *hanging-drop* Verfahren erhalten werden: 0,1 M HEPES pH 7, 17 % w/v PEG 3350, 0,2 M CsCl.

Die am ESRF untersuchten Kristalle (ID14-4) des Substitutionsproteins waren nicht in der Lage, Synchrotronstrahlung in ausreichendem Maße zu beugen. Die erhaltenen Datensätze wurden deshalb nicht zur Gewinnung von Phaseninformationen verwendet.

5.3.1.8. Ermittlung der dreidimensionalen Proteinstruktur

Bei der Messung der Röntgenreflexe sind die Phasen der auf dem Detektor aufgetroffenen Strahlung nicht direkt experimentell bestimmbar. Durch die schlechte Qualität der Datensätze des Selenomethionin-markierten P-Proteins wurden keine Phaseninformationen erhalten. Um das Phasenproblem zu lösen, wurde deshalb mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.*, 2007) ein *molecular replacement* durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Phaseninformation des kristallografischen Datensatzes eines Proteins verwendet, welches wahrscheinlich eine ähnliche dreidimensionale Struktur wie das untersuchte Protein hat. Je höher die Sequenzidentität der Referenz zur Probe ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Erfolges. Ab 30-40 % Identität lohnt sich ein Versuch. Als Suchmodell zur Gewinnung der Phaseninformation des *Synechocystis* P-Proteins wurde die einzig bekannte P-Protein-Struktur des Enzyms aus *T. thermophilus* genutzt (pdb: 1wyt; (Nakai *et al.*, 2005). Dies ermöglichte die erste Erstellung einer interpretierbaren Elektronendichtekarte. In diese wurden mit dem Programmpaket ARP/wARP AS-Sequenzen des *Synechocystis* P-Proteins eingefügt (Abb. 51, Perrakis *et al.*, 1999). Die weiteren Untersuchungen und Auswertungen zur Strukturaufklärung des *Synechocystis* P-Proteins sind momentan Gegenstand der aktuellen Arbeiten von Frau Dr. E. Andersson in Uppsala. Erste Erkenntnisse aus diesen Arbeiten werden im Diskussionsteil dieser Dissertation vorgestellt und erörtert.

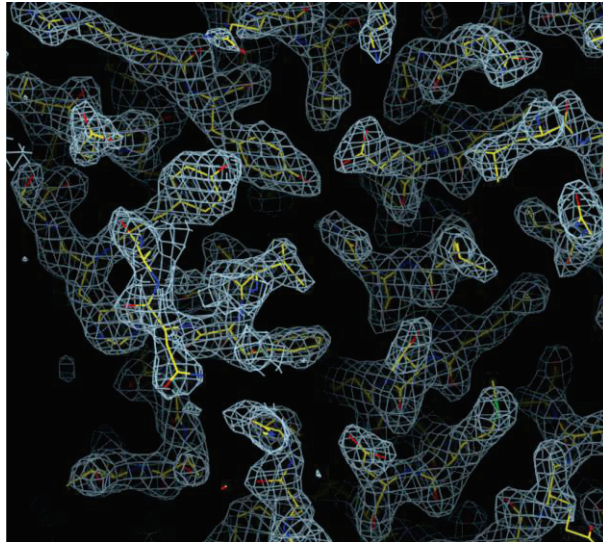


Abb. 51: Ausschnitt aus der nach *molecular replacement* erhaltenen Elektronendichtekarte des *Synechocystis* P-Proteins. Als Suchmodell wurde das P-Protein aus *T. thermophilus* genutzt (pdb: 1wyt).

5.3.2. Kristallisation des L-Proteins aus *Synechocystis*

5.3.2.1. Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen

Für die Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen wurden kommerziell erhältliche Kits genutzt. Die Bildung von ersten Mikrokristallen wurde bereits nach kurzer Zeit (2-3 Tage) beobachtet. Dabei handelte es sich vorwiegend um nadelförmige Kristalle, die aus einem Zentrum radial in alle Richtungen wuchsen.

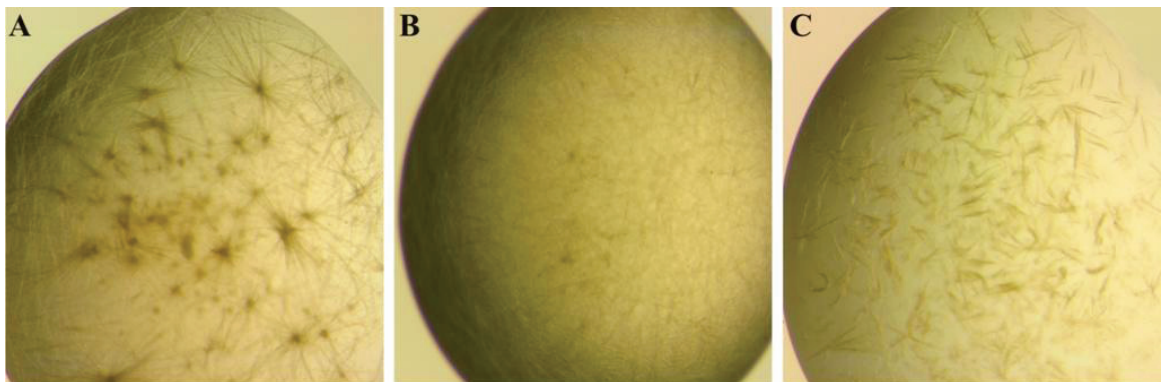


Abb. 52: Mikroskopische Aufnahmen von nadelförmigen L-Protein-Kristallen. A: Diese Kristalle wurden mit Pufferlösung B10 (0,1 M Bicine pH 9, 10 % w/v PEG 20000, 2 % v/v Dioxan) des JCSG+ Suite (Qiagen) erhalten. B: Diese Kristalle wurden mit Pufferlösung E10 (0,1 M Bicine pH 9, 10 % w/v PEG 6000) des JCSG+ Suite (Qiagen) synthetisiert. C: Die Kristalle in Bild C wurden mit Pufferlösung H12 des Crystal Screen HT (Hampton Research) erzeugt. Die Zusammensetzung dieser Reservoirlösung ist identisch zu der in Bild A verwendeten Lösung.

Durch die gelbe Färbung der Mikrokristalle wurde davon ausgegangen, dass es sich um L-Protein-Kristalle handelte. Die Ausbildung von nadelförmigen Kristallen ist außerdem für Salzkristalle nicht üblich. Die Pufferzusammensetzungen, mit denen die Nadelkristalle erhalten wurden, waren sehr ähnlich (Abb. 52). Alle Reservoirlösungen wiesen einen basischen pH-Wert von 9 auf und enthielten hochmolekulares Polyethylenglycol. Die Synthese dieser nadelförmigen Kristalle war gut reproduzierbar. Die Bildung von dreidimensionalen L-Protein-Kristallen wurde mit diesen Pufferbedingungen jedoch nicht erreicht.

5.3.2.2. Optimierung der Kristallqualität des *Synechocystis* L-Proteins

Nach Erhalt der Nadelkristalle des L-Proteins wurde versucht, die Kristallisationsbedingungen zu optimieren. Der Ausgangspunkt dieser Optimierung waren die für die Synthese der Mikrokristalle genutzten Reservoirlösungen. Durch die Veränderung der Zusammensetzung dieser Reservoirlösung sowie der gewählten Inkubationsbedingungen wurde versucht, sich den idealen Kristallisationsverhältnissen anzunähern. In den dafür verwendeten zweidimensionalen Optimierungsscreens wurden jeweils zwei Bedingungen, wie z. B. die Konzentration und der pH-Wert der präzipitierenden Agens, geändert. Die Konzentrationen aller weiteren Komponenten der Reservoirlösungen (z. B. Salze, Proteinkonzentration) wurden konstant gehalten. Zusätzlich wurde das Tropfenvolumen verdoppelt.

Mithilfe dieser Optimierungsexperimente gelang zunächst die Reproduktion der L-Protein-Mikrokristalle, die jedoch für eine röntgenkristallografische Untersuchung nicht geeignet waren. Das Wachstum erster dreidimensionaler Kristalle fand erst nach einer ca. sechsmonatigen Inkubation der Platten bei 20 °C statt. Die verwendeten Bedingungen und Reservoirlösungen waren größtenteils zu den in Abb. 53 aufgeführten identisch. Es wurde allerdings ein deutlich geringerer pH-Wert (pH 6) verwendet (Abb. 53). Die entstandenen Kristalle waren teilweise ineinander verwachsen oder wiesen bereits Risse auf. Dennoch wurden sie für die Aufnahme von röntgenkristallografischen Datensätzen genutzt. Die ineinander gewachsenen Kristalle aus Bild A (Abb. 53) wurden dafür vorher mechanisch voneinander getrennt. Danach wurden alle L-Protein-Kristalle für mehrere Sekunden in einer Kryo-Lösung inkubiert, anschließend mit einem Nylon-Loop geeigneter Größe aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem auf ca. 77 K gekühlten Thermobehälter bis zur Aufnahme des Datensatzes gelagert. Die Zusammensetzung der verwendeten Kryo-Lösung war mit der Reservoirlösung identisch, mit der die jeweiligen Kristalle erhalten werden konnten. Jedoch wurden der Kryolösung zusätzlich 20 % Ethylenglycol (v/v) zugesetzt.

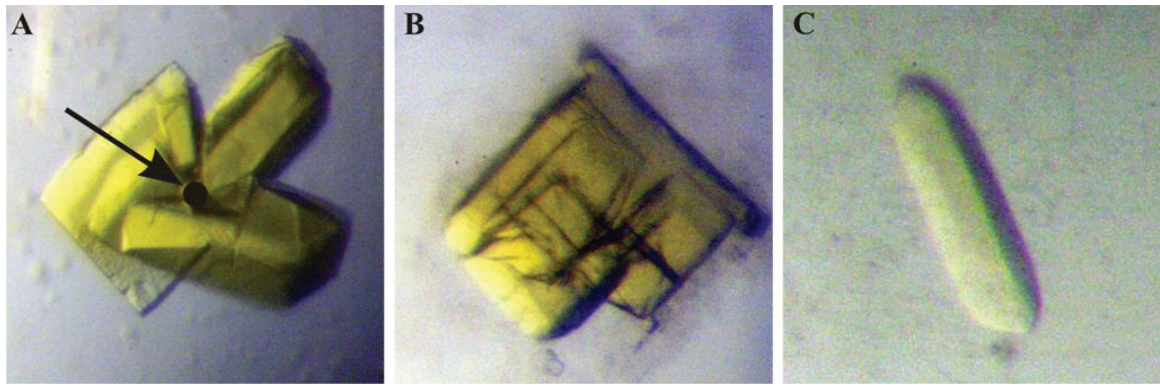


Abb. 53: Mikroskopische Aufnahmen von dreidimensionalen L-Protein-Kristallen. A: Diese Kristalle wurden mit 0,1 M MES pH 6,5; 10 % w/v PEG 6000 als Reservoir-Lösung erhalten. Für die am ESRF in Grenoble durchgeführten röntgenkristallografischen Untersuchungen wurden die Kristalle voneinander getrennt. Hierzu wurde mechanischer Druck mit einer Nadelspitze auf den mit dem Pfeil markierten Punkt ausgeübt. B: Diese Kristalle wurden mit 0,1 M MES pH 6,0; 8 % w/v PEG 6000 als Reservoir-Lösung erhalten. C: Diese Kristalle wurden mit 0,1 M MES pH 6,5; 12 % w/v PEG 6000 als Reservoir-Lösung erhalten.

Die röntgenkristallografischen Untersuchungen mit den dreidimensionalen L-Protein-Kristallen wurden von Frau Dr. Evalena Andersson aus der AG Andersson am ESRF in Grenoble durchgeführt. Die analysierten L-Protein-Kristalle streuten die Synchrotronstrahlung nur sehr schwach. Ein Datensatz eines L-Protein-Kristalls wurde aus diesem Grund nicht aufgenommen.

In nachfolgenden Experimenten wurde eine erneute Verbesserung der Kristallqualität versucht. Dies konnte durch die langen Inkubationszeiten der Tropfen nicht abgeschlossen werden. Auch durch *streak seeding*, einer häufig verwendeten Methode zur Verbesserung der Qualität von Proteinkristallen, konnten keine Kristalle mit verbesserten Eigenschaften synthetisiert werden.

6. Diskussion

6.1. Die Biochemie des P-Proteins

GCS aller Organismen ist ein Multienzym-System und besteht aus vier Komponenten (P-, H-, T- und L-Protein), welche die reversible Decarboxylierung von Glycin katalysieren. Als Reaktionsprodukte entstehen CO_2 , $\text{CH}_3\text{-THF}$, NH_3 und NADH. Deshalb wird GCS auch als Glycin-Decarboxylase/Synthase bezeichnet (Andreesen, 1994). Die Glycin-Synthase-Aktivität wurde bisher für die Organismen *A. globiformes* (Kochi & Kikuchi, 1974, 1976), *C. acidurici* (Gariboldi & Drake, 1984) und *E. acidaminophilum* (Freudenberg & Andreesen, 1989) beschrieben.

Diese Dissertation beschränkt sich auf die Betrachtung der Biochemie des P- und H-Proteins. Beide Proteine wurden heterolog exprimiert, gereinigt und anschließend charakterisiert. Damit ist das *Synechocystis* P-Protein auch die erste heterolog exprimierte Glycin-Decarboxylase, die enzymatisch aktiv ist und ausführlich biochemisch charakterisiert wurde. Das P-Protein ist die eigentliche Glycin-decarboxylierende Untereinheit, die auch ohne H-Protein die Bicarbonat-Austauschreaktion katalysieren kann. Die Syntheserate von ^{14}C -Glycin war jedoch ohne Aminomethylen-Akzeptor nur sehr gering. Ein ähnliches Ergebnis wurde ebenfalls mit dem P-Protein aus Mitochondrien der Hühnerleber erhalten (Hiraga & Kikuchi, 1980). Weitere Arbeitsgruppen konnten mit P-Proteinen aus *A. globiformis*, *P. glycinophilus*, *E. acidaminophilum* und *P. sativum* nur eine P-Protein-Aktivität im Beisein von Aminomethylen-Akzeptoren wie dem H-Protein oder Liponsäure messen (Freudenberg & Andreesen, 1989, Kochi & Kikuchi, 1976, Robinson *et al.*, 1973, Walker & Oliver, 1986). Der Grund für diese Diskrepanz liegt möglicherweise in der Menge des eingesetzten Enzyms, denn nur mit einer hohen Konzentration des *Synechocystis* P-Proteins im Messansatz gelang die Ermittlung der Enzymaktivität ohne H-Protein. Wie bereits mit P-Proteinen aus anderen Organismen bestätigt, wurde durch Zugabe des alternativen Aminomethylen-Akzeptors Liponsäure eine höhere Enzymaktivität erreicht (Hiraga & Kikuchi, 1980, Kochi & Kikuchi, 1976, Robinson *et al.*, 1973). Der erhaltene K_m -Wert für Liponsäure ist mit 2 mM vergleichbar mit den Daten aus *A. globiformis* (16 mM) und Huhn (3 mM) und damit viel größer als die ermittelten K_m -Werte der jeweiligen H-Proteine (Hiraga & Kikuchi, 1980, Kochi & Kikuchi, 1976). Die maximale Enzymaktivität des *Synechocystis* P-Proteins mit $5,53 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ wurde nur in Kombination mit dem natürlichen Reaktionspartner, dem H-Protein, erreicht. Damit ist die Enzymaktivität des P-Proteins aus *Synechocystis* nahezu identisch mit bereits ermittelten Daten aus *P. sativum* und *E. acidaminophilum* (Douce *et al.*, 2001, Freudenberg & Andreesen, 1989, Klein & Sagers, 1966b). In Tabelle 36 sind die ermittelten biochemischen Parameter von P-Proteinen verschiedener Organismen miteinander verglichen.

Tabelle 36: Zusammenfassung biochemischer Parameter von P-Proteinen verschiedener Spezies. Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Bicarbonat-Austauschreaktion verwendet. n.b. = nicht bestimmt

Art	Typ	V_{\max} in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	K_m -Glycin in mM	K_m -H-Protein in μM	Referenzen
<i>Synechocystis</i>	α_2	5,53	3,21	0,47	(Hasse <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. sativum</i>	α_2	5,08	1,7	9	(Douce <i>et al.</i> , 2001)
Huhn	α_2	n.b.	5,8	3,4	(Fujiwara & Motokawa, 1983)
Ratte	α_2	$1,25 \times 10^{-4}$	2,8 mM	n.b.	(Sato <i>et al.</i> , 1969)
<i>E. acidaminophilum</i>	α_2, β_2	1,86	n.b.	2	(Freudenberg & Andreessen, 1989)
<i>P. glycinophilus</i>	α_2, β_2	40	32	100	(Klein & Sagers, 1966b)
<i>C. acidurici</i> (Zellextrakt)	α_2, β_2	9,5	n.b.	n.b.	(Gariboldi & Drake, 1984)

Die außerordentlich hohe Streuung der erhaltenen Daten für die P-Protein-Aktivität aus den verschiedenen Organismen offenbart die komplexe GCS-Struktur und die komplizierte *in vitro* Bestimmung der biochemischen Parameter. Neben den von mir erhaltenen Ergebnissen mit dem rekombinanten Enzym aus *Synechocystis* gibt es noch einen ähnlich vollständigen Datensatz für das gereinigte P-Protein aus *P. sativum* (Douce *et al.*, 2001). Bei deren direktem Vergleich stimmen die erhaltenen K_m - und V_{\max} -Werte sehr gut überein. Offensichtlich besitzen pflanzliche und cyanobakterielle P-Proteine nahezu identische biochemische Eigenschaften.

Die zur Bestimmung der P-Protein-Aktivität genutzte Austauschreaktion war stark pH-abhängig. Das Optimum der Reaktion lag bei pH 6. Dies ist insofern erstaunlich, da der physiologische pH von *Synechocystis* bei ca. 8 liegt (Berry *et al.*, 2005). Der Grund für diese Diskrepanz liegt am verwendeten Messsystem. Der vermessene Einbau des radioaktiv-markierten Kohlenstoffs aus Bicarbonat in das Glycin ist eine nicht-physiologische Reaktion. Das eigentliche Reaktionsprodukt der Decarboxylase-Reaktion ist CO_2 und nicht Bicarbonat. Demzufolge dient nicht Bicarbonat als Substrat für die fälschlicherweise als Bicarbonat-Austausch bezeichnete Reaktion, sondern CO_2 (Sarojini & Oliver, 1983). In einer wässrigen Lösung bildet sich zwischen CO_2 und HCO_3^- ein Gleichgewicht, das erst bei leicht sauren pH-Werten auf der Seite des CO_2 liegt. Das pH-Optimum von P-Proteinen anderer Organismen befand sich ebenfalls im neutralen bis leicht sauren Bereich. So wurde für die

Austauschreaktionen der P-Proteine aus Huhn und Ratte ein pH-Optimum von 6,5 bzw. 6,8 festgestellt (Fujiwara & Motokawa, 1983, Motokawa & Kikuchi, 1974). Ein pH-Optimum von 7 wurde für die Enzyme aus *P. sativum*, *C. acidurici* und *E. acidaminophilum* ermittelt (Freudenberg & Andreessen, 1989, Gariboldi & Drake, 1984, Sarojini & Oliver, 1983). Bei dem physiologischen pH 8 sank die Aktivität des *Synechocystis* Enzyms auf 50 % im Vergleich zum pH-Optimum. Das P- und H-Protein aus dem Cyanobakterium waren bei allen vermessenen pH-Werten stabil. Dies wurde durch einen linearen Reaktionsverlauf verifiziert.

In dieser Dissertation wurden zum ersten Mal die Substrateigenschaften eines rekombinanten H-Proteins mit N-terminalem Histidin-Tag in Bezug auf die Enzymaktivität eines P-Proteins überprüft. Bei dem Vergleich mit dem identischen Protein ohne N-terminale Extension ergab sich eine Abnahme der Aktivität um 35-45 %. Dieser negative Einfluss einer Proteinfusion scheint bei einem Protein dieser Größe nicht verwunderlich. Doch dieser Befund könnte noch weitere Gründe haben. Aufgrund der hohen Sequenzidentität des *Synechocystis* H-Proteins von 47 % zum H-Protein aus *P. sativum* kann von einer nahezu identischen Molekülstruktur ausgegangen werden. Erhärtet wird diese Annahme dadurch, dass die Strukturmodelle der H-Proteine aus *P. sativum* und *T. thermophilus* nahezu identisch sind (Nakai *et al.*, 2003). Diese weisen zueinander eine Identität von 47 % auf. In dem dreidimensionalen Modell des H-Proteins aus *P. sativum* (Abb. 54) ist die räumliche Nähe des N-Terminus zum Lipoamidarm des Proteins ersichtlich. Durch eine angefügte N-terminale Extension besteht die Möglichkeit der Beeinflussung der Mobilität der Liponsäure, was einen negativen Einfluss auf das Zusammenwirken mit dem P-Protein haben könnte.

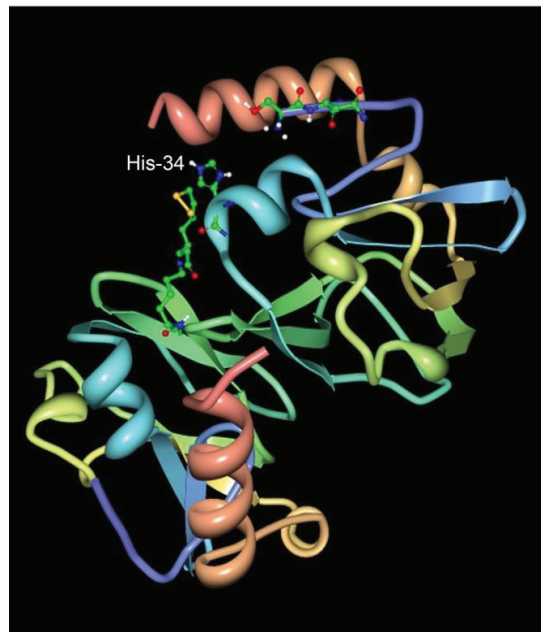


Abb. 54: 3-D Struktur des H-Proteins aus *P. sativum*. Hervorgehoben sind die zwei N-terminalen AS sowie der Lipoamidarm des oberen H-Proteins der asymmetrischen Einheit (Hasse *et al.*, 2009).

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung des negativen Einflusses der N-terminalen Extension besteht in der Modifikation der Bindungseigenschaften des H-Proteins an das P-Protein. H-Proteine sind relativ saure Proteine. Anhand der bereits bekannten Proteinstrukturen wurde die Region II definiert, welche für die P-Protein-Bindung eine Rolle spielt (Nakai *et al.*, 2003). In diesem Bereich des Proteins häufen sich Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten (Abb. 56). In der Region II des H-Proteins aus *T. thermophilus* (nahe des N-Terminus) befinden sich vermehrt saure Aminosäuren. Das H-Protein aus *Synechocystis* besitzt am N-Terminus ebenfalls zwei negativ geladene Glutamatreste. Eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Region II ist deshalb sehr wahrscheinlich. Die N-terminale Fusion mit einem polaren His-Tag könnte die Struktur der Region II verändern und somit die Bindung an das P-Protein negativ beeinflussen. Unterstützt wird diese These durch den leicht erhöhten K_m -Wert des H-Proteins mit Affinitätstag ($1,0 \mu\text{M}$) gegenüber dem H-Protein ohne Fusion ($0,47 \mu\text{M}$).

Eine relativ feste Bindung des H-Proteins an das P-Protein wurde bereits früher von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Besonders gut wurde die Interaktion der Proteine aus der Leber von Vertebraten untersucht (Kikuchi & Hiraga, 1982). Mit Fluoreszenzstudien des Enzyms aus Huhn wurde eine deutliche Verschiebung P-Protein-typischer Absorptionsspektren nach Zugabe des H-Proteins festgestellt. Begründet wurde dieser Effekt mit einer Bindung des H-Proteins an das P-Protein, was zu einer Beeinflussung der P-Protein-Struktur führte. Mit zusätzlich durchgeführten Gelfiltrationsexperimenten wurde die relativ feste Bindung beider Proteine verifiziert (Kikuchi & Hiraga, 1982). Bei der Auftrennung einer Mischung aus P- und H-Proteinen (Verhältnis 1:6) wurde ein beachtlicher Teil des H-Proteins zusammen mit dem P-Protein eluiert. Dieses Ergebnis wurde stark vom pH-Wert und der Ionenkonzentration des verwendeten Pufferpuffers beeinflusst. Bei pH 6,6 wurde das P- und H-Protein in einem Verhältnis von 1:2 eluiert. Bei höheren pH-Werten wurde immer weniger Proteinkomplex erhalten. Eine relativ feste Bindung zwischen P- und H-Protein aus *Synechocystis* wurde auch in den im Zeitraum dieser Dissertation durchgeführten Experimenten festgestellt (nicht gezeigt). In einem *pull-down*-Experiment wurde rekombinantes P-Protein an Ni^{2+} -Sephrose gebunden. Als Pufferbedingung wurde ein Niedrigsalzpuffer mit pH 6,5 gewählt. Nachdem eine Lösung mit H-Protein über die Säule lief, wurden nach mehreren Waschschritten geringe Mengen an H-Protein zusammen mit dem gebundenen Enzym co-eluiert. Ein identisches Experiment mit dem P-Protein aus Huhn ergab ein vergleichbares Ergebnis (Fujiwara & Motokawa, 1983). Indirekt bestätigt wird die pH-Abhängigkeit der H-Proteinbindung zusätzlich durch den erhöhten K_m des *Synechocystis* H-Proteins bei pH 8 ($12,3 \mu\text{M}$) gegenüber pH 6 ($0,47 \mu\text{M}$). Diese pH-Abhängigkeit der Bindung ist zusätzlich eine mögliche Erklärung für das breite Spektrum der publizierten K_m -Werte für das H-Protein, da sich die verwendeten pH-Bedingungen teils deutlich unterscheiden (Tabelle 36). Die negative Beeinflussung der Proteininteraktionen bei höheren Ionenkonzentrationen liegt in der Maskierung der für die Bindung beider Proteine wichtigen

Aminosäureseitenketten. Interaktionen zwischen den GCS-Proteinen wurden häufig nur mit der Verwendung von Niedrigsalzpuffern beobachtet (Kikuchi & Hiraga, 1982, Oliver *et al.*, 1990).

Bei allen getesteten Reaktionsbedingungen blieb der Glycin- K_m -Wert stabil. Das Fehlen von Aminomethylen-Akzeptor, Liponsäure als alternativer Akzeptor, die Zugabe von H-Protein sowie unterschiedliche pH-Werte hatten darauf keinen Einfluss. Dieses Ergebnis deutet an, dass beide Substrate unabhängig voneinander an das P-Protein binden und anschließend die chemische Reaktion katalysiert wird. Dieses Ergebnis steht im Konflikt mit den Ergebnissen des P-Proteins aus Huhn, dessen Glycin- K_m -Wert von 15 mM auf 4 mM nach der Zugabe von H-Protein gesenkt wurde (Kikuchi & Hiraga, 1982). Erstaunlicherweise wurden mit dem gleichen Enzym von einer anderen Arbeitsgruppe gegensätzliche Ergebnisse erhalten (Fujiwara & Motokawa, 1983).

Meine Resultate belegen, dass es möglich ist, aktives rekombinantes P- sowie H-Protein aus *Synechocystis* zu erhalten. Während der durchgeführten Messungen verhielt sich das H-Protein eher als Substrat und nicht als Bestandteil eines Komplexes. Der im Vergleich zu pH 6 relativ hohe K_m -Wert des H-Proteins bei pH 8 ist möglicherweise ein Grund für den beobachteten Überschuss dieses Proteins *in vivo*. Die erhaltenen Daten zeigen darüber hinaus, dass die biochemischen Eigenschaften des cyanobakteriellen Systems denen vom P- und H-Protein aus Vertebraten und Pflanzen sehr stark gleichen. Die rekombinanten GCS-Proteine aus *Synechocystis* eignen sich deshalb zum Studium eukaryotischer GCS-Proteine in struktureller sowie biochemischer Hinsicht.

6.2. Kooperation von H-Proteinen mit dem P-Protein aus *Synechocystis*

Das Gen *sll0879* kodiert für das H-Protein aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, welches eine Molmasse von 14,6 kD besitzt. Eine Auswahl von in der UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) aufgeführten Proteinen, welche signifikante Ähnlichkeiten zu dem H-Protein aus *Synechocystis* aufweisen, ist in Tabelle 37 aufgeführt. Zum Vergleich wurden auch Proteine eukaryotischer Herkunft wie z. B. aus *P. sativum*, *A. thaliana*, *F. trinervia* und *H. sapiens* herangezogen. Die höchste Identität zeigt das Protein aus *Synechocystis* zu H-Proteinen cyanobakteriellen Ursprungs. Die Identität zu vielen weiteren pro- und eukaryotischen H-Proteinen ist häufig geringer als 50 %.

Tabelle 37: Vergleich des H-Proteins aus *Synechocystis* mit Proteinen aus der UniProt-Datenbank

Organismus	AS	kD	IP	acc. nr.	Identität in %
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	132	14,6	3,92	P73560	
<i>Synechococcus</i> sp.	132	14,8	3,88	B1XNI3	59
<i>T. elongatus</i> BP-1	127	13,5	3,87	Q8DIB2	58

<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806	131	14,4	3,98	A8YIB3	56
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	130	14,4	3,92	Q8YNF8	53
<i>Acaryochloris marina</i>	128	13,7	3,97	B0C921	51
<i>X. campestris</i>	131	14,0	4,03	Q8P6T9	51
<i>B. subtilis</i>	127	14,3	4,12	O32174	49
<i>T. thermophilus</i> HB8	128	14,01	4,09	Q5SKW9	46
<i>C. botulinum</i> Bf.	130	14,6	4,03	B1QLP6	45
<i>E. coli</i> K12	129	13,8	4,01	P0A6T9	44
<i>P. sativum</i>	131	14,0	4,65	P16048	47
<i>F. trinervia</i> GLDH ^{AA}	134	14,2	4,91	P46485	47
<i>A. thaliana</i> GLDH1	131	14,2	4,73	Q42403	46
<i>A. thaliana</i> GLDH3	132	14,3	4,55	O82179	51
<i>H. sapiens</i>	125	13,8	4,36	P23434	42

H-Proteine sind kleine, relativ saure und hitzestabile Proteine mit Liponsäure (6,8-Dithioloctansäure) als funktionelle Gruppe (Andreesen, 1994, Fujiwara *et al.*, 1979, Robinson *et al.*, 1973). Ihre Größe wurde für einige Pro- und Eukaryoten experimentell ermittelt. Die Molmassen entsprechen oftmals den *in silico* berechneten Werten. So wurde für das H-Protein aus *E. acidaminophilum* die errechnete Molmasse von 13 kD bestätigt (Freudenberg & Andreesen, 1989). Die Proteine weiterer prokaryotischer Vertreter haben ähnliche Größen, z. B. aus *P. glycinophilus* und *T. thermophilus* mit 12,6 kD bzw. 14,1 kD (Nakai *et al.*, 2003, Robinson *et al.*, 1973). Untersuchte H-Proteine aus Eukaryoten sind z. B. das Protein aus der Ratte mit einer Größe von 17 kD (Motokawa & Kikuchi, 1969), 13,9 kD für das H-Protein aus dem Huhn und 14,1 kD für den Vertreter aus *P. sativum* (Kim & Oliver, 1990, Macherel *et al.*, 1990). Diese Aufzählung ist zum einen ein Beleg für die ubiquitäre Verbreitung und zum anderen für das häufig beschriebene Vorkommen der H-Proteine als Monomer. Die erhaltenen Ergebnisse in dieser Dissertation widersprechen jedoch letzterer Aussage. Die durch Glycin-SDS-PAGE ermittelten Molmassen der bakteriellen H-Proteine aus *Synechocystis* und *E. coli* mit ca. 35 bzw. 30 kD weichen stark von dem *in silico* ermittelten Werten ab und sprechen eher für eine Dimerisierung der Polypeptide. Das Ergebnis der durchgeführten Massenspektrometrie mit dem *Synechocystis*-Protein unterstützt diese Annahme jedoch nicht. Für dieses Verfahren mussten die Proteinproben jedoch speziell vorbereitet werden, wodurch Bindungen zwischen den H-Protein-Untereinheiten aufgebrochen worden sein könnten (Dr. Stefan Mikkat, mündl. Mitteilg.). Die untersuchten eukaryotischen H-Proteine aus *A. thaliana*, *F. trinervia* und *H. sapiens* liefen in der durchgeführten SDS-Glycin-PAGE als Monomer. Zur weiteren Absicherung dieser Ergebnisse wurden Massenbestimmungen mit einer geeichten Größenausschluss säule

durchgeführt. Diese bestätigten das vorwiegend dimere Vorkommen des *Synechocystis* H-Proteins. Die Ergebnisse des Proteins aus *E. coli* sprechen ebenso für das Vorkommen als Dimer oder sogar für das Auftreten weiterer Oligomerisierungszustände. Unter nativen Bedingungen treten die pflanzlichen H-Proteine ebenfalls nicht ausschließlich als Monomer auf. In der durchgeführten Glycin-SDS-PAGE mit dem nativem Ladepuffer wurden sowohl dimere als auch monomere Zustände der H-Proteine aus *A. thaliana* und *F. trinervia* beobachtet. Diese Ergebnisse konnten wiederum durch Gelfiltrationsexperimente verifiziert werden. Doch während das *F. trinervia* Protein vorwiegend als Dimer vorkam, wurden für das H-Protein aus *A. thaliana* weitere oligomere Zustände inklusive dem H-Protein-Monomer bestimmt.

Was ist also der Grund dafür, dass H-Proteine häufig als monomere Proteine angesehen werden? Häufig wurde zur Bestimmung der Proteingröße eine denaturierende SDS-PAGE durchgeführt. Das Erfassen von Protein-Protein-Interaktionen ist auf diesem Wege unmöglich, wie die Ergebnisse mit den pflanzlichen H-Proteinen belegen (Abb. 13, Abb. 32). Erstaunlich ist es eher, dass die H-Proteine aus *Synechocystis* als auch *E. coli* selbst unter diesen denaturierenden Bedingungen anscheinend in einem dimeren Zustand vorlagen. Es gibt weitere unabhängig publizierte Daten für das oligomere Vorkommen von H-Proteinen. Das während dieser Arbeiten heterolog exprimierte H-Protein aus *H. sapiens* hatte in der SDS-PAGE eine Größe von 16 kD. Gelfiltrationsexperimente mit dem aus der humanen Leber gereinigten H-Protein sprachen aber auch hier für das Vorkommen als Dimer (Hiraga *et al.*, 1981). In Gelfiltrations- und SDS-PAGE-Experimenten wurden des Weiteren tetramere und monomere Formen des H-Proteins aus *P. glycinophilus* erfasst. Die tetramere Form des Proteins konnte dabei in beiden Fällen durch Zugabe von Reduktionsäquivalent in die monomere Form überführt werden (Robinson *et al.*, 1973). Diesbezüglich wurde auch in dieser Arbeit ein Einfluss von Reduktionsmitteln wie DTT oder β -Mercaptoethanol auf die Oligomerisierung der pflanzlichen H-Proteine festgestellt (Abb. 32). Das Auftreten von dimeren pflanzlichen H-Proteinen konnte darüber hinaus unabhängig von den hier durchgeführten Versuchen gezeigt werden (Oliver, 1994). Die erhaltenen und bereits publizierten Ergebnisse lassen eine redoxabhängige Oligomerisierung von pflanzlichen H-Proteinen vermuten. Die dafür benötigten Thio-redoxine kommen in pflanzlichen Mitochondrien vor und die physikalischen Interaktionen dieser Proteine mit GCS-Komponenten wurden bereits experimentell bestätigt (Balmer *et al.*, 2004, Marti *et al.*, 2009). Die Zugabe von Reduktionsmitteln hatte auf den Oligomerisierungsstatus des H-Proteins aus *Synechocystis* jedoch keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu wurde mit dem Protein aus *E. coli* eine Beeinflussung des Oligomerisierungsstatus festgestellt. Im C-terminalen Bereich fast aller pflanzlicher H-Proteine befindet sich ein konserviertes Cystein. Dieser Cysteinrest könnte für die beobachtete redoxabhängige Oligomerisierung pflanzlicher H-Proteine von Bedeutung sein (Abb. 55). Die GCS-Regulation in Abhängigkeit vom Redoxstatus der mitochondrialen Matrix wurde experimentell bestätigt (Palmieri *et al.*, 2010, Sarojini &

Oliver, 1983). Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln konnte die GCS-Aktivität gesteigert werden. Auch eine negative GCS-Regulation in *A. thaliana* durch Nitrosylierung der Cysteinreste aller GCS-Komponenten wurde kürzlich experimentell bestätigt (Palmieri *et al.*, 2010).

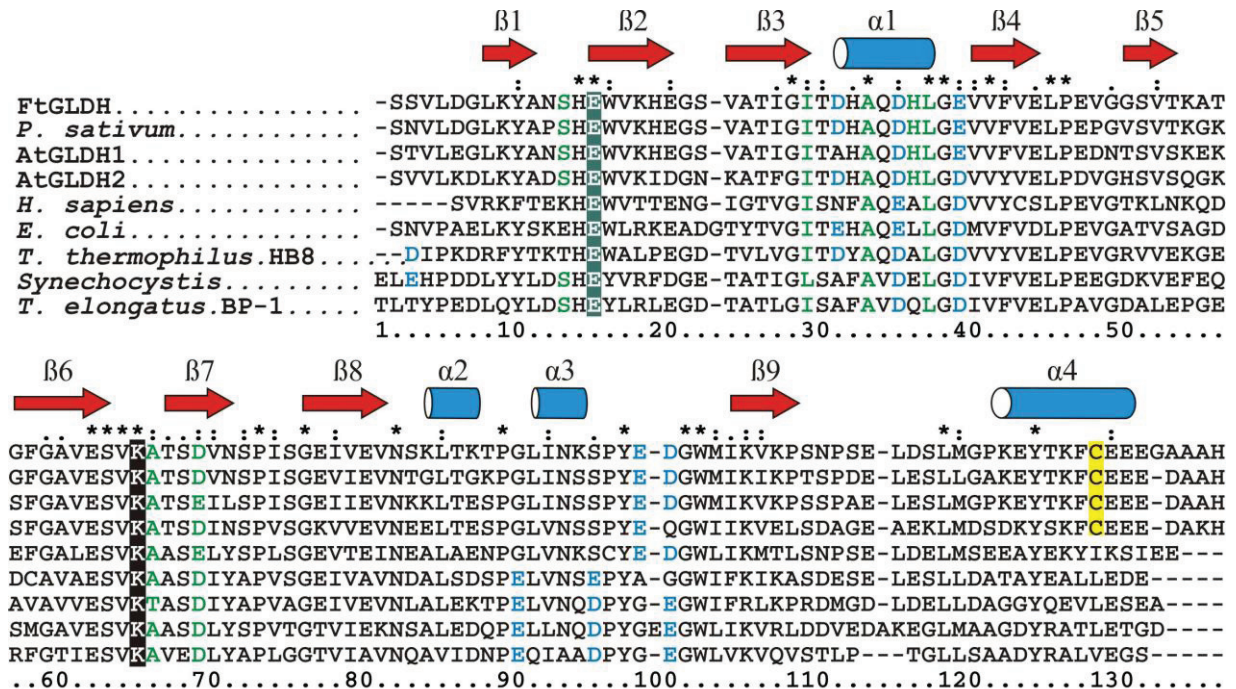


Abb. 55: Aminosäure-Alignment verschiedener H-Proteine. Gezeigt ist ein mit ClustalX durchgeführtes Alignment der prokaryotischen H-Proteine aus *Synechocystis* (UniProt P73560), *T. elongatus* BP-1 (UniProt Q8DIB2), *T. thermophilus* (UniProt Q72LB0) und *E. coli* (UniProt B7LF90) bzw. der eukaryotischen H-Proteine aus *P. sativum* (P16048), *F. trinervia* (CAA88734), *H. sapiens* (P24434) und *A. thaliana* (GLDH1: UniProt P25855; GLDH2: UniProt O82179). Blaue Röhren oberhalb der Sequenzen kennzeichnen α -Helices und rote Pfeile β -Faltblätter. Der für die kovalente Modifikation mit Liponsäure benötigte Lysinrest wurde schwarz hinterlegt. AS, welche den mit der Aminomethylengruppe beladenen Lipoamidarm stabilisieren, sind grün dargestellt (Cohen-Addad *et al.*, 1997, Cohen-Addad *et al.*, 1995, Nakai *et al.*, 2003). Blau markierte AS sind Teil der Region II der H-Proteine und könnten für die Interaktion mit dem P-Protein von Bedeutung sein (Nakai *et al.*, 2003). Im C-Terminus vieler pflanzlicher H-Proteine befindet sich ein konservierter Cysteinrest. Dieses Cystein wurde gelb markiert.

Die bisher aufgelösten Strukturen der H-Proteine aus *P. sativum* und *T. thermophilus* werden als *hybrid-barrel sandwich* Struktur beschrieben, die aus zwei antiparallelen β -Faltblättern besteht, welche um 140° gedreht sind. Die beiden aus sechs bzw. drei β -Strängen bestehenden Faltblätter sind durch einen flexiblen *loop* einer *hairpin* Struktur, die aus einer α -Helix besteht, verbunden (Cohen-Addad *et al.*, 1997, Cohen-Addad *et al.*, 1995, Nakai *et al.*, 2003, Pares *et al.*, 1994, Pares *et al.*, 1995). Liponsäure, als funktionelle Gruppe des Proteins, ist mit der ϵ -Aminogruppe eines in dieser Struktur befindlichen Lysinrests über eine Amidbindung verknüpft. Dadurch ist der Lipoamidarm an der Oberfläche der H-Proteine lokalisiert. Der Lysinrest aller bisher beschriebenen H-Proteine ist hoch konserviert (Abb. 55, schwarz unterlegt) und essenziell für die Funktionalität des Proteins (Cohen-Addad *et al.*, 1995, Fujiwara *et al.*, 1986, Nakai *et al.*, 2003, Pares *et al.*, 1994, Pares *et al.*, 1995).

Die sich an der Oberfläche des Proteins befindende oxidierte bzw. reduzierte Form des Lipoamidarms ist frei beweglich. Wird dieser vom P-Protein mit einer Aminomethylengruppe beladen, kommt es zu einer Drehung um 90° (Cohen-Addad *et al.*, 1995). Dadurch findet eine Umlagerung der prosthetischen Gruppe in eine Vertiefung des Proteins statt. Wechselwirkungen mit einem stark konservierten Glutamatrest (Abb. 55, grün unterlegt) stabilisieren den Lipoamidarm in dieser Position. Durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Resten Ser¹², Ile²⁷, Ala³¹, Leu³⁵, Ala⁶⁴ und Asp⁶⁷ (bezogen auf das Protein aus *P. sativum*) wird die Aminomethylengruppe vor nukleophilen Angriffen von OH⁻-Ionen aus der umgebenden Lösung geschützt, was die nichtenzymatische Umwandlung zu NH₃ und Formaldehyd verhindert (Cohen-Addad *et al.*, 1997, Cohen-Addad *et al.*, 1995, Nakai *et al.*, 2003, Pares *et al.*, 1994, Pares *et al.*, 1995). Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt bei pflanzlichen H-Proteinen durch die Interaktion mit His³⁴. Dieser Rest ist aber nur wenig konserviert, was den Lipoamidarm pflanzlicher H-Proteine im Vergleich zu anderen Proteinen, wie z. B. dem Protein aus *T. thermophilus*, weniger beweglich macht (Nakai *et al.*, 2003).

Viele der im letzten Absatz beschriebenen Aminosäuren sind stark konserviert oder durch Aminosäuren mit identischen biochemischen Eigenschaften substituiert. Dies lässt vermuten, dass die Aminomethylen tragende funktionelle Gruppe bei allen H-Proteinen geschützt in einer Vertiefung des Proteins liegt. Die H-Proteine aus *P. sativum* sowie *T. thermophilus* sind, wie bereits erwähnt, zu 47 % identisch und deren 3-D-Struktur ist nahezu gleich (Nakai *et al.*, 2003). Das H-Protein aus *Synechocystis* besitzt zu beiden Proteinen eine Identität von 47 % bzw. 46 %. Eine ähnliche Struktur des cyanobakteriellen H-Proteins zu den bisher bekannten Strukturen aus *P. sativum* und *T. thermophilus* ist deshalb zu vermuten.

Es wurde bereits in früheren Arbeiten publiziert, dass P- und H-Protein aus der Hühnerleber von den korrespondierenden Proteinen aus *A. globiformis* ersetzt werden können (Hayasaka *et al.*, 1980). Dies bewies, dass ein eukaryotisches H-Protein durch ein prokaryotisches H-Protein ersetzt werden kann. Genaue biochemische Analysen zum Austausch von pro- bzw. eukaryotischen GCS-Komponenten liegen aber bis heute nicht vor. Aus diesem Grund wurde das rekombinante cyanobakterielle P-Protein mit weiteren H-Proteinen beider Domänen in Enzymtests kombiniert. Mit allen getesteten H-Proteinen wurden biochemische Aktivitäten in Form von Michaelis-Menten-Kinetiken gemessen. Darüber hinaus liegen alle ermittelten V_{max}-Werte in einem Bereich von 3,5 – 5,5 µmol min⁻¹ mg⁻¹ und waren somit nahezu identisch. Dies unterstützt wiederum die These, dass trotz der großen evolutionären Abstände zwischen den untersuchten Organismen die Struktur der H-Proteine nahezu identisch geblieben sein muss.

Große Unterschiede gab es hingegen bezüglich der gemessenen K_m-Werte der H-Proteine. Während das *Synechocystis* P-Protein *in vitro* schon bei geringen Konzentrationen von prokaryotischen H-Proteinen gesättigt war, mussten die pflanzlichen H-Proteine in großem Überschuss im Enzymansatz vorhanden sein, um eine Sättigung der Reaktion zu erzielen. Die

ermittelten K_m -Werte der pflanzlichen H-Proteine überstiegen die der bakteriellen H-Proteine um den Faktor 100. H-Proteine werden als Co-Substrat der anderen GCS-Proteine, speziell aber des P-Proteins, angesehen (Fujiwara & Motokawa, 1983, Kim & Oliver, 1990, Nakai *et al.*, 2005, Oliver *et al.*, 1990). Die erhaltenen K_m -Werte sind dabei das Ergebnis verschiedener Ereignisse. Dazu gehört zum einen die Bindung des H-Proteins an das P-Protein, zum anderen die Katalyse der Reaktion und die Dissoziation des H-Proteins vom P-Protein. Dies bedeutet wiederum, dass die größeren K_m -Werte der pflanzlichen Proteine auf schwächere Wechselwirkungen mit dem bakteriellen P-Protein zurückzuführen sein könnten.

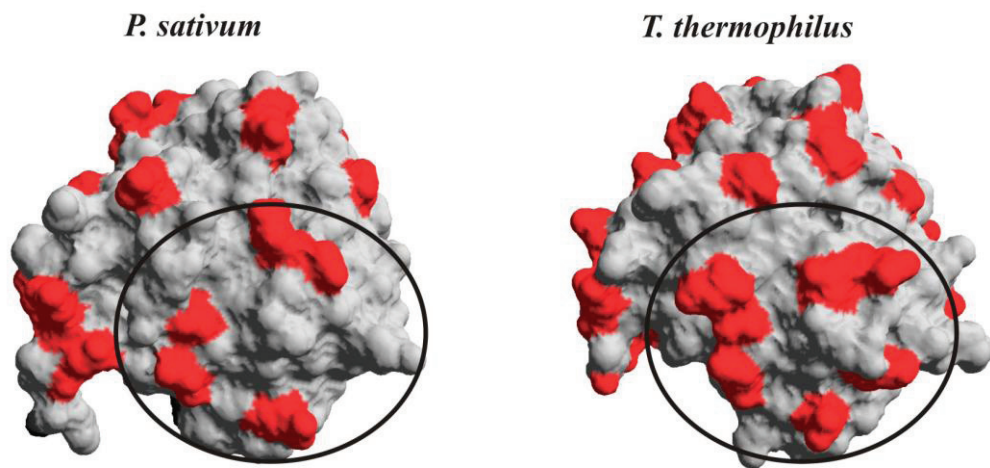


Abb. 56: Modelle der molekularen Oberflächen der H-Proteine aus *P. sativum* und *T. thermophilus*. Die negativ geladenen Aminosäuren wurden rot markiert. Die Region II der H-Proteine ist mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet. Zur Erstellung der Bilder wurde der Swiss-PDB-Viewer genutzt (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

In einem *in silico* Modell wurde die Interaktion des H-Proteins mit dem P-Protein aus *T. thermophilus* simuliert (Nakai *et al.*, 2005). Das Enzym besitzt einen Kanal, der mit der Liponsäure des H-Proteins über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert. An der Oberfläche des P-Proteins umgeben den Kanal konservierte, positiv geladene Aminosäuren (Nakai *et al.*, 2005). Diese stehen bei der Bindung beider Proteine mit negativ geladenen Aminosäuren des H-Proteins in Wechselwirkung. Bei der Betrachtung der *in silico* ermittelten isoelektrischen Punkte der H-Proteine aus Tabelle 37 wird ersichtlich, dass prokaryotische H-Proteine generell etwas saurer sind als ihre eukaryotischen Verwandten. Durch die oft identische Anzahl der Aminosäuren der reifen Proteine müssen die niedrigeren isoelektrischen Punkte auf eine größere Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren zurückzuführen sein. Anhand der bekannten H-Protein-Strukturen wurden mehrere konservierte Aminosäuren identifiziert, die mit dem P-Protein in Wechselwirkung treten könnten (Abb. 55). Beim Vergleich der Strukturmodelle der H-Proteine aus *P. sativum* (PDB: 1HTP) und *T. thermophilus* (PDB: 1ONL) zeigt sich eine größere Anzahl saurer Aminosäuren in der Region II des prokaryotischen H-Proteins (Abb. 56). Dies korreliert mit dem niedrigeren isoelektrischen Punkt des Proteins aus *T. thermophilus* (Tabelle 37).

Anhand der bekannten Proteinstrukturen wurden 3-D-Modelle einiger der in dieser Dissertation exprimierten H-Proteine berechnet (<http://www.uniprot.org/uniprot>). Bei einem Vergleich der Regionen II der Strukturmodelle wird eine größere Anzahl saurer Aminosäuren bei den prokaryotischen H-Proteinen sichtbar (Abb. 57). Dies stimmt wiederum mit den generell niedrigeren isoelektrischen Punkten der prokaryotischen H-Proteine überein. Die Auswertung dieser Strukturmodelle lässt die Spekulation zu, dass der P-Protein-bindende Bereich prokaryotischer H-Proteine mehr negativ geladene Aminosäuren enthält, was wiederum zu einer stärkeren Bindung an das P-Protein führt. Die *in vitro* gemessenen Daten würden diese Theorie bestätigen.

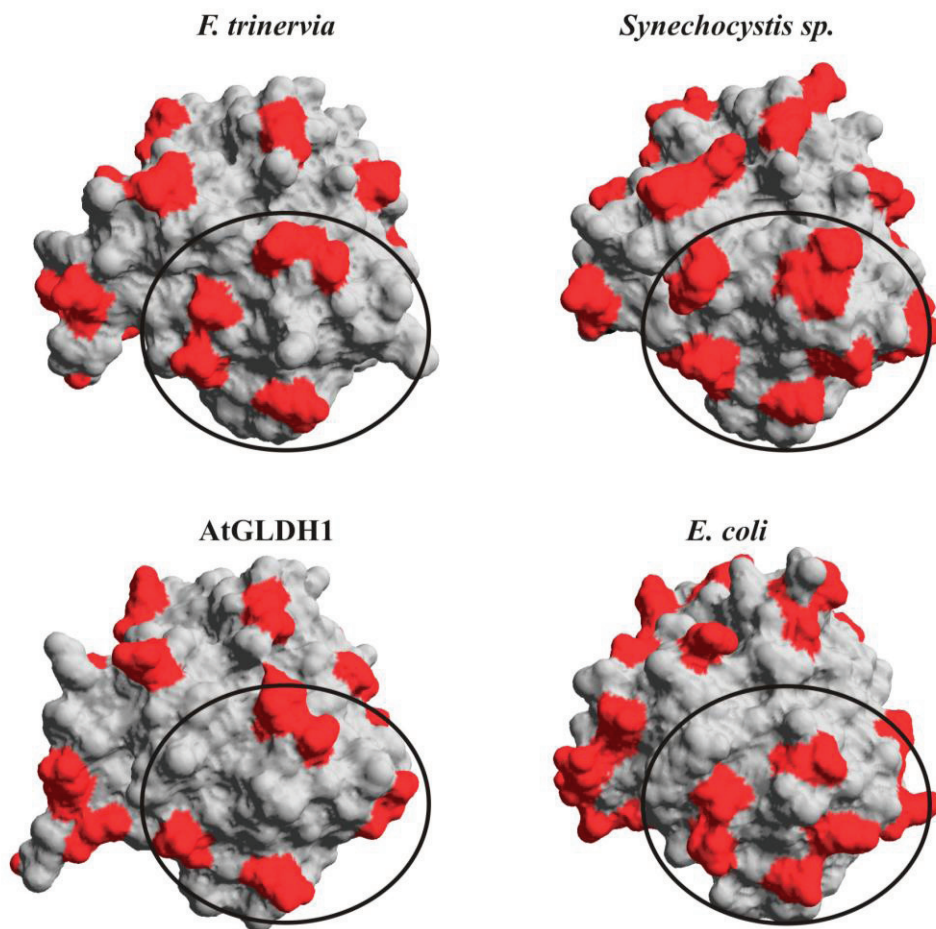


Abb. 57: *In silico* erstellte Modelle der H-Proteine aus *F. trinervia*, *Synechocystis* und *A. thaliana* durch Vergleich mit bereits bekannten Strukturen. Die Struktur des H-Proteins aus *E. coli* wurde kürzlich aufgeklärt (PDB: 3A7L). Die negativ geladenen Aminosäuren wurden rot markiert. Die Region II der H-Proteine ist mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet. Zur Erstellung der Bilder wurde der Swiss-PDB-Viewer genutzt (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

Eine Ausnahme ist das menschliche H-Protein. Als einziges der hier untersuchten eukaryotischen H-Proteine hat es zu den prokaryotischen Proteinen einen nahezu identischen K_m -Wert. Der isoelektrische Punkt des Proteins ist zwar im Vergleich zu anderen eukaryotischen H-Proteinen sehr gering (Tabelle 37), jedoch konnte mit dem *in silico*

erstellten Strukturmodell kein deutlicher Unterschied in der Anzahl saurer Aminosäuren in der Region II zu den pflanzlichen H-Proteinen festgestellt werden. Eine ClustalX-Analyse der H-Proteine von Wirbeltieren zeigt aber im Gegensatz zu den pflanzlichen H-Proteinen eine nähere Verwandtschaft zu den prokaryotischen H-Proteinen (Abb. 58). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die starke Differenz zwischen den K_m -Werten des humanen und der pflanzlichen H-Proteine sein.

6.3. Modifikation der GCS-Aktivität durch alternatives Spleißen des H-Proteins in *F. trinervia*

Die Interaktion des cyanobakteriellen P-Proteins mit allen untersuchten H-Proteinen unterstreicht die Eignung dieses Enzyms als Modellprotein für eukaryotische P-Proteine. Diese Aussage wird durch die Tatsache unterstützt, dass es möglich war, biochemische Unterschiede zwischen den H-Proteinen FtGLDH und FtGLDH^{AA} aus *F. trinervia* zu messen. Diese C₄-Art der Gattung *Flaveria* verfügt über nur ein H-Protein-Gen. Nach dessen Transkription werden durch Nutzung zweier *splice*-Akzeptorstellen (alternatives Spleißen) die oben erwähnten H-Proteine gebildet (Kopriva *et al.*, 1995). Dieser Vorgang findet ebenfalls in anderen fortgeschrittenen C₄-Arten dieser Gattung wie *F. palmeri*, *F. bidentis* und *F. australasica* statt (Kopriva *et al.*, 1996). Weitere *Flaveria*-Arten mit C₃ oder C₃-C₄ intermediärer Photosynthese dagegen haben nur ein H-Protein oder verfügen über eine H-Protein-Multigenfamilie (Kopriva & Bauwe, 1995, Kopriva *et al.*, 1996). Schon früher wurde darüber spekuliert, dass die Modifikation der H-Proteine durch alternatives Spleißen die Gesamtleistung des GCS modifizieren könnte. Meine Ergebnisse bestätigen zumindest eine um ca. 20 % erhöhte Aktivität des Proteins FtGLDH^{AA} gegenüber FtGLDH und damit eine bessere Substrateigenschaft von FtGLDH^{AA} für das P-Protein (Hasse *et al.*, 2009). Dieser Effekt wurde ebenfalls durch eine artifizielle Mutation des H-Proteins AtGLDH1 aus *A. thaliana* bestätigt und beweist zusätzlich, dass die Insertion von zwei Alanin-Molekülen am N-Terminus der reifen pflanzlichen H-Proteine die Leistungsfähigkeit des *Synechocystis* P-Proteins erhöht. Darüber hinaus wurden diese Ergebnisse auch in Kombination mit dem pflanzlichen P-Protein aus *P. sativum* bestätigt. Hierzu wurde ein Mitochondrienextrakt vermessen, dem das zu untersuchende Co-Substrat beigemischt wurde, was zu einer positiven Beeinflussung der P-Protein-Aktivität im Extrakt führt (Hasse *et al.*, 2009, Walker & Oliver, 1986).

Warum könnte sich diese Modifikation des H-Proteins vorteilhaft auswirken? Am Untersuchungsobjekt *Populus* wurde die Rolle des GCS für den pflanzlichen C₁-Stoffwechsel in heterotrophen Geweben untersucht. Die GCS-Konzentration ist dort nahe der Detektionsgrenze (Bourguignon *et al.*, 1993). Dennoch ist bekannt, dass GCS in diesen Geweben in Kooperation mit der SHMT C₁-Kohlenstoffeinheiten für zahlreiche Biosynthesen bereitstellt (Mouillon *et al.*, 1999). Dabei wird Serin von einer zytosolischen SHMT in Glycin

konvertiert, welches anschließend in die Mitochondrien transportiert und über GCS und SHMT wieder zu Serin umgewandelt wird. Serin wird danach wiederum in das Zytosol transportiert. Damit wird ein C_1 -Einheiten generierender Reaktionszyklus (Glycin-Serin-Zyklus) geschlossen (Mouillon *et al.*, 1999). Pflanzen wie *P. trichocarpa* benötigen in den heterotrophen Geweben besonders viel C_1 -Kohlenstoff für die Synthese von Lignin. Erstaunlicherweise kodiert diese Pflanze zwei H-Proteine PtGDH1 und PtGDH2, welche sich phylogenetisch von denen in den photosynthetisch aktiven Geweben vorkommenden H-Proteinen PtGDH3 und PtGDH4 unterscheiden (Rajinikanth *et al.*, 2007). Betrachtet man die H-Proteine aus Pflanzen wie *O. sativa*, *S. bicolor*, *A. thaliana*, *M. truncatula* und *V. vinifera* wird deutlich, dass es zwei Gruppen von pflanzlichen H-Proteinen gibt (Abb. 58). Die im Blattmesophyll an der Photorespiration beteiligten H-Proteine sowie die in den heterotrophen Geweben exprimierten H-Proteine bilden dabei jeweils ein eigenständiges phylogenetisches Cluster. Die Betrachtung dieses Stammbaums lässt darüber hinaus eine nähere Verwandtschaft der H-Proteine aus den heterotrophen Geweben (hier C_1 -H-Proteine genannt) zu den bakteriellen H-Proteinen vermuten. Die in den photosynthetischen Geweben synthetisierten H-Proteine werden auch als Klasse 1 H-Proteine oder photorespiratorische H-Proteine bezeichnet, während die H-Proteine aus heterotrophen Geweben als Klasse 2 oder C_1 -H-Proteine betitelt werden (Rajinikanth *et al.*, 2007). In *A. thaliana* ist die Expression der Klasse 1 H-Proteine AtGLDH1 und AtGLDH2 und des Klasse 2 H-Proteins AtGLDH3 unterschiedlich reguliert (Abb. 7). Dies trifft ebenso auf die H-Proteine aus *P. trichocarpa* zu. Dabei werden die Proteine der Klasse 1 vorwiegend in den grünen Blattorganen synthetisiert, während die Klasse 2 H-Proteine in den heterotrophen Geweben exprimiert werden. Durch die fehlenden Expressionsdaten weiterer Pflanzen ist jedoch eine Verallgemeinerung dieser Genregulation für alle Pflanzen mit Klasse 1 bzw. 2 H-Proteinen nicht möglich. Zusätzlich zu den Expressionsdaten gibt es darüber hinaus bei genauer Betrachtung kleine Unterschiede in der P-Protein bindenden Region 2 der H-Proteine AtGLDH1 und AtGLDH3. So ist feststellbar, dass AtGLDH3 in diesem Bereich über mehr negativ geladene Aminosäuren als AtGLDH1 verfügt (Abb. 59). Der isoelektrische Punkt von AtGLDH3 ist gegenüber AtGLDH1 ebenfalls etwas geringer (Tabelle 37). Dies könnte eine stärkere und damit bessere Bindung von AtGLDH3 an das P-Protein ermöglichen, was insbesondere bei geringen GCS-Konzentrationen in Wurzelmitochondrien vorteilhaft wäre. Dies lässt sich bis jetzt zwar nicht beweisen, jedoch könnte diese These durch die Bestimmung eines niedrigeren K_m -Wertes von AtGLDH3 gegenüber AtGLDH1 in weiteren Tests erhärtet werden.

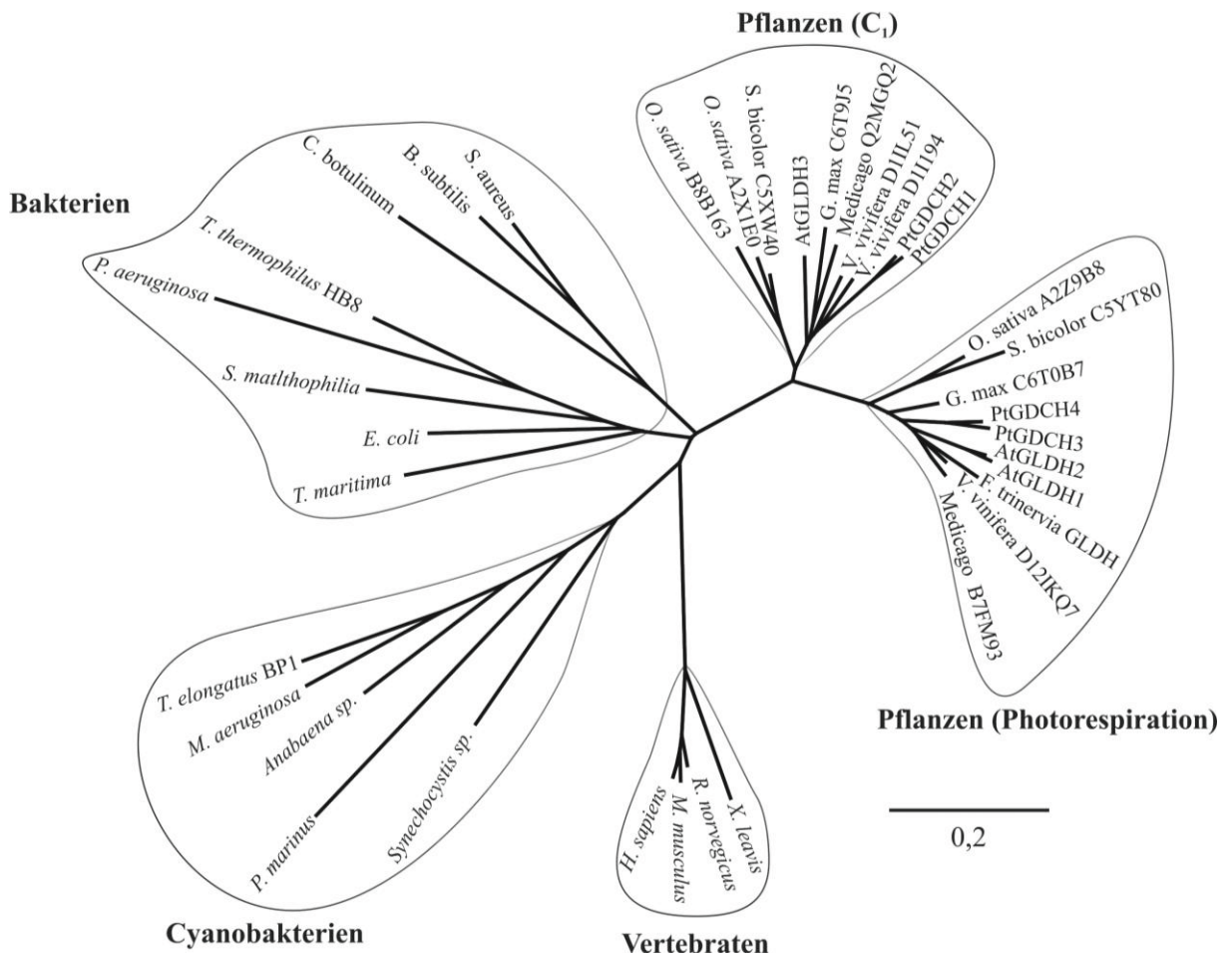


Abb. 58: Unrooted phylogenetischer Stammbaum von H-Proteinen verschiedener pro- und eukaryotischer Organismen erzeugt durch ein Protein-Alignment mit dem Programm ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Der Stammbaum wurde mit dem Programm TreeView (Page, 1996) angefertigt. Für die phylogenetische Analyse wurden die H-Proteine folgender pro- und eukaryotischen Organismen genutzt: *Anabaena* sp. PCC 7120 (Q8YNF8), *A. thaliana* (AtGLDH1: P25855; AtGLDH2: Q9LQL0; AtGLDH3: Q82179), *B. subtilis* (O32174), *B. taurus* (P20821), *C. botulinum* (A7FRV4), *E. coli* (B7LF90), *F. trinervia* (P46485), *G. max* (C6T0B7, C6T9J5), *H. sapiens* (P23434), *M. truncatula* (B7FM93, Q2MGQ2), *M. aeruginosa* (B0LRJ5), *M. musculus* (Q9CY75), *O. sativa* (A2Z9B8, A2X1E0, B8B163), *P. sativum* (P16048), *P. trichocarpa* (PtGDH1: B9IQ46; PtGDH2: B9ICP5; PtGDH3: A9PG07; PtGDH4: B9MTZ6), *P. marinus* (A3PFF7), *P. aeruginosa* (Q9I136), *R. norvegicus* (Q9QYU8), *S. bicolor* (C5XW40, C5YT80), *S. aureus* (Q6GB23), *S. malthophilia* (B2FR20), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (P73560), *T. elongatus* BP1 (Q8DIB2), *T. maritima* (Q9WY55), *T. thermophilus* (Q72LB0), *V. vinifera* (D1I194, D1IKQ7, D1IL51), *X. laevis* (Q242S1).

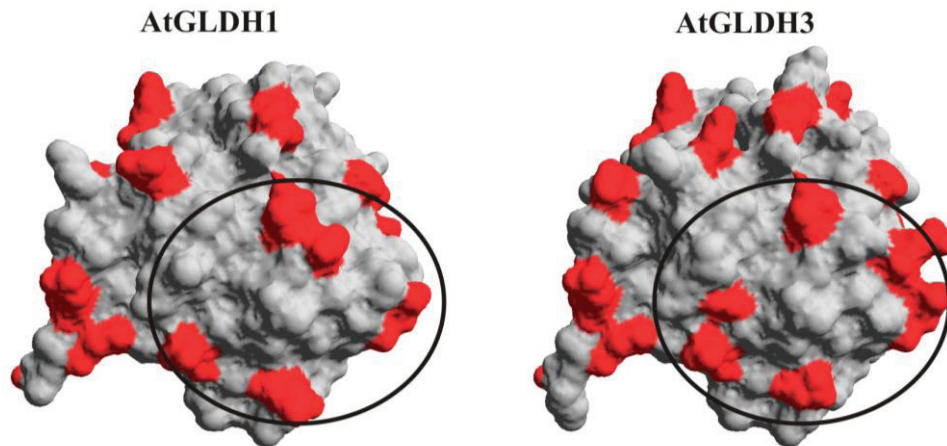


Abb. 59: *In silico* erstellte Modelle der H-Proteine AtGLDH1 und AtGLDH3 aus *A. thaliana* durch Vergleich mit bereits bekannten Strukturen. Die negativ geladenen Aminosäuren wurden rot markiert. Die Region II der H-Proteine ist mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet. Zur Erstellung der Bilder wurde der Swiss-PDB-Viewer genutzt (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

Die beiden Spleißformen des H-Proteins aus *F. trinervia* gehören zur Klasse 1. Interessanterweise wird das alternative Spleißen der prä-mRNA reguliert (Kopriva *et al.*, 1995). FtGLDH wird vorwiegend in den heterotrophen Pflanzengewebe exprimiert, während in den photosynthetisch aktiven Geweben der Pflanze hauptsächlich FtGLDH^{AA} gebildet wird. Damit sind Parallelen zur differenziellen Regulation von Klasse 1 und Klasse 2 H-Proteinen erkennbar. Somit könnte das alternative Spleißen der H-Proteine aus *F. trinervia* eine andere Art der H-Protein-Anpassung an die Bedürfnisse eines in photosynthetischen bzw. heterotrophen Geweben lokalisierten GCS sein.

Die Erzeugung von unterschiedlichen H-Proteinen durch alternatives Spleißen scheint zum jetzigen Zeitpunkt nur ein Merkmal der weiter fortgeschrittenen C₄-Arten der Gattung *Flaveria* zu sein. In den Genomen der C₄-Arten *Z. mays* sowie *S. bicolor* gibt es keine Indizien für ein alternatives Spleißen von H-Proteinen. Das Genom von *S. bicolor* kodiert darüber hinaus zwei H-Proteine, wobei C5YT80 der Klasse 1 und C5XW40 der Klasse 2 zugeordnet werden kann (Abb. 58). Das Maisgenom kodiert ebenfalls mehrere H-Proteine.

In dieser Dissertation konnte mit den H-Protein FtGLDH^{AA} eine 20%ige Steigerung der P-Protein-Aktivität gegenüber FtGLDH gemessen werden. Gegenüber C₃-Pflanzen ist der photorespiratorische Fluss von Kohlenstoffeinheiten in C₄-Pflanzen sehr gering. Deshalb ist die GCS-Konzentration in diesen Pflanzen selbst in photosynthetischen Geweben sehr gering. Dennoch ist die Photorespiration in diesen Pflanzen ein essenzieller Reaktionszyklus (Zelitch *et al.*, 2009). Darüber hinaus steigt die Photorespirationsrate in C₄-Pflanzen bei osmotischem Stress und hohen Temperaturen deutlich an (Osmond & Harris, 1971). Bei diesen Bedingungen könnte ein H-Protein, welches die Gesamtleistung des GCS positiv beeinflusst, von Vorteil sein und eine Limitierung des photorespiratorischen Stoffwechsels verhindern. Durch Zusatz von rekombinantem H-Protein konnte auch die P-Protein-Aktivität in

Mitochondrienextrakten aus Erbse gesteigert werden (Hasse *et al.*, 2009). Inwieweit das ein Hinweis auf eine limitierende Rolle der H-Proteinmenge für die *in vivo* GCS-Aktivität darstellt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Über die Ursache der Aktivitätssteigerung durch die Insertion der zwei Alanin-Moleküle am N-Terminus des H-Proteins FtGLDH^{AA} kann ebenfalls nur spekuliert werden. Jedoch bewegt sich der N-Terminus des Proteins durch die Insertion der zwei Alanin-Moleküle in Richtung des His³⁴. Diese Aminosäure stabilisiert in Pflanzen den Liponsäurerest über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken (Nakai *et al.*, 2003, Pares *et al.*, 1994, Pares *et al.*, 1995). Es ist deshalb eine Beeinflussung von His³⁴ denkbar. Dies könnte die Beweglichkeit des Liponsäurearms positiv beeinflussen. Weiterhin ist der N-Terminus ein Teil der Region II und könnte somit auch die Ladungsarchitektur an der Oberfläche und damit die P-Protein-Bindung beeinflussen.

6.4. Die Struktur des P-Proteins aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Neben der biochemischen Charakterisierung des P-Proteins war ein weiteres Hauptziel dieser Dissertation die Aufklärung der Proteinstruktur des *Synechocystis* P-Proteins und damit die Bestimmung der ersten dreidimensionalen Struktur eines homodimeren P-Proteins. Das Enzym wird in *Synechocystis* vom Leserahmen *slr0293* kodiert. In der Tabelle 38 sind einige der in der Uni-Prot-Datenbank enthaltenen Proteine aufgelistet, die signifikante Ähnlichkeiten zum P-Protein aus *Synechocystis* aufweisen.

Das P-Protein ist ubiquitär verbreitet und wurde bereits aus einer Vielzahl von Pro- und Eukaryoten isoliert. Viele prokaryotische Proteine wie z. B. das Enzym aus *T. thermophilus* haben den Aufbau eines $\alpha_2\beta_2$ -Tetramers. Die α -Untereinheit hat eine Größe von 47,1 kD. Die β -Untereinheit ist 52,7 kD groß (Nakai *et al.*, 2003, Nakai *et al.*, 2005). Die molekulare Masse des Gesamtproteins beträgt daher 200 kD. Dieses P-Protein ist bislang das Einzige, dessen Proteinstruktur bekannt ist. Weitere beschriebene P-Proteine mit heterotetramerem Aufbau sind die Enzyme aus *E. acidaminophilum*, *A. aeolicus*, *B. subtilis*, *A. globiformis*, *P. glycinophilus* und *C. acidurici* (Deckert *et al.*, 1998, Freudenberg & Andreesen, 1989, Gariboldi & Drake, 1984, Klein & Sagers, 1966b, Kochi & Kikuchi, 1974, Kunst *et al.*, 1997). Homodimere bakterielle P-Proteine wurden in *E. coli* (Okamura-Ikeda *et al.*, 1993), *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *S. typhimurium* (Stauffer *et al.*, 1989) und *Synechocystis* (Hasse *et al.*, 2007) beschrieben. Eukaryoten besitzen dagegen generell P-Proteine mit homodimerem Aufbau. Diese Proteine sind für ihre mitochondriale Lokalisation mit einem 35-86 Aminosäuren langen *leader peptide* am N-Terminus fusioniert. Die Größe der eukaryotischen Monomere ist mit denen der prokaryotischen Monomere bzw. $\alpha\beta$ -Dimere vergleichbar. So wurde u. a. für das humane P-Protein eine Größe von 112 kD und für das Enzym aus Huhn eine Größe von 111,8 kD für die jeweiligen Monomere bestimmt (Hiraga & Kikuchi, 1980, Kume *et al.*, 1991). Beschriebene pflanzliche Enzyme sind das P-Protein aus

P. sativum (Oliver *et al.*, 1990, Turner *et al.*, 1993) mit einer Größe von 105 kD für das Monomer und zwei der fünf in *F. pringlii* vorkommenden P-Proteine (Bauwe *et al.*, 1995). Letztere besitzen eine molekulare Masse von 106 kD und haben eine *leader*-Sequenz von 33 bzw. 36 Aminosäuren. Das *leader peptide* aus *P. sativum* ist mit 86 Aminosäuren außergewöhnlich lang.

Tabelle 38: Vergleich der Proteinsequenz des P-Proteins aus *Synechocystis* mit Proteinen aus der UniProt-Datenbank

Organismus	AS	kD	acc. nr.	Identität in %
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	983	107,3	P74416	
<i>M. aeruginosa</i>	981	107,0	A8YBW4	72,3
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	983	107,7	Q8YNF9	70,4
<i>Synechococcus</i> sp.	982	107,6	B1XNL5	68,6
<i>T. elongates</i> BP1	954	103,8	Q8DIIB	65,7
<i>A. thaliana</i> P-Protein 1	972	105,5	O80988	57,5
<i>F. trinervia</i>	971	105,9	O49852	57,1
<i>H. sapiens</i>	985	109,1	P23378	54,7
<i>E. coli</i>	957	104,4	B7LF89	54,5
<i>T. thermophilus</i> $\alpha+\beta$	911	100	α : Q5SKW8; β : P62030	37

In der phylogenetischen Analyse der Abb. 60 grenzen sich die heterotetrameren P-Proteine deutlich von den homodimeren P-Proteinen ab. Das homodimere P-Protein aus *Synechocystis* weist gegenüber dem Enzym aus *T. thermophilus* einen höheren Verwandtschaftsgrad zu den pflanzlichen und tierischen Enzymen auf. Auch die Unterschiede in der Anzahl der Aminosäuren und vor allem der heterotetramere Aufbau des *T. thermophilus* P-Proteins verleihen dem Ausdruck. Eine cyanobakterielle P-Protein-Struktur kann deshalb bessere Aussagen über die Funktionsweise homodimerer P-Proteine liefern und zusätzlich vielleicht sogar bessere Einblicke in den Aufbau eines vermeintlichen GCS-Komplexes liefern. Darüber hinaus könnte mit dem enzymatisch aktiven P-Protein aus *Synechocystis* eine detaillierte Struktur-Funktions-Analyse *in vitro* durchgeführt werden.

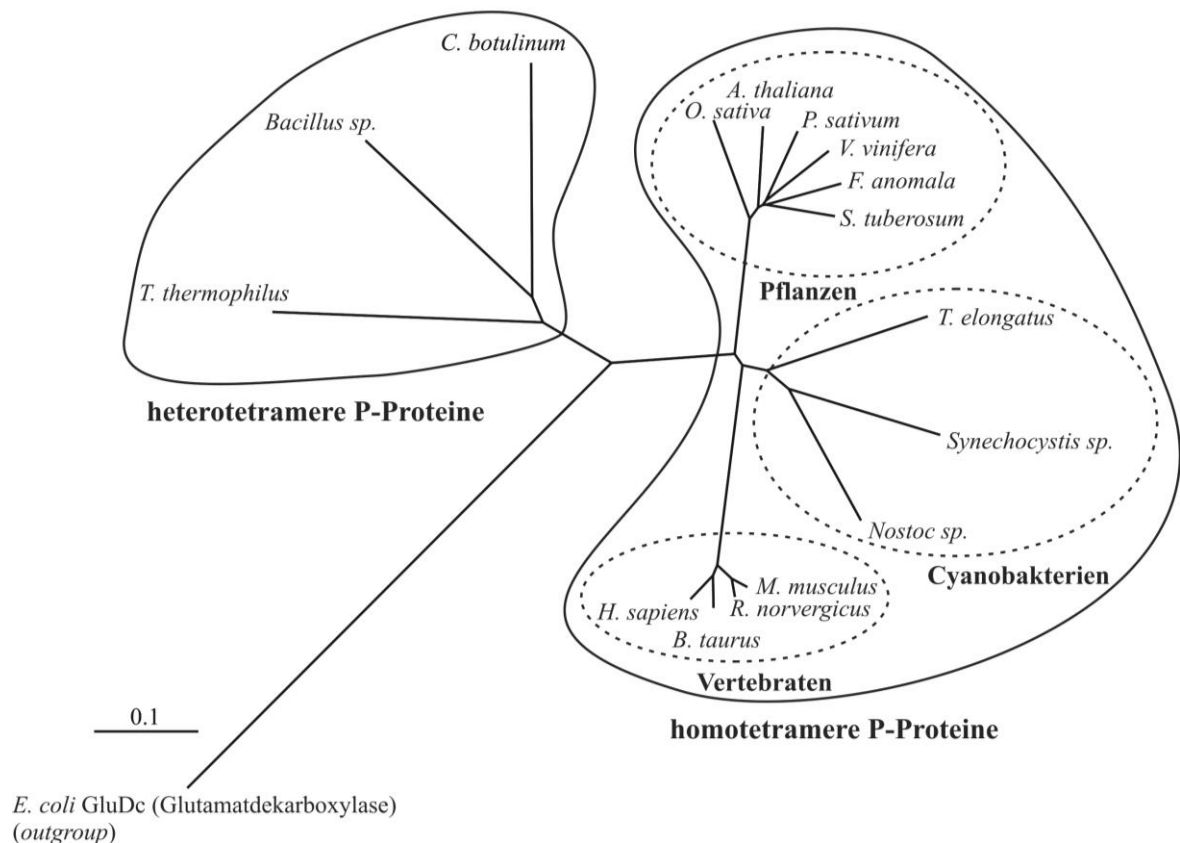


Abb. 60: Phylogenetischer Stammbaum von P-Proteinen (Hasse *et al.*, 2010) mit homo- und heterotetramerem Aufbau verschiedener pro- und eukaryotischer Organismen, erzeugt durch ein Protein-Alignment mit dem Programm ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Für den Vergleich der homo- und heterotetrameren Enzyme wurden die α -Untereinheiten und mit den jeweiligen β -Untereinheiten fusioniert. Der Stammbaum wurde mit dem Programm TreeView angefertigt (Page, 1996). Die Glutamatdecarboxylase aus *E. coli* (NP_287662) wurde als *outgroup* definiert. Für die phylogenetische Analyse wurden die P-Proteine folgender pro- und eukaryotischer Organismen genutzt: *Synechocystis* sp. PCC 6803 (P74416), *T. elongatus* BP1 (NP_682393), *Anabaena* sp. PCC 7120 (NP_488647), *O. sativa* (AAQ24377), *A. thaliana* (BAE98954), *P. sativum* (P26969), *S. tuberosum* (O49954), *F. anomala* (O49850), *V. vinifera* (XP_002279590), *M. musculus* (NP_613061), *B. taurus* (XP_869239), *H. sapiens* (NP_000161), *R. norvegicus* (NP_001101053), *T. thermophilus* HB8 (α : YP_143791; β : YP_143792), *Bacillus* sp. (α : ZP_01725792; β : ZP_01725793), *C. botulinum* (α : YP_001253239; β : YP_001253240).

Trotz der relativ großen Unterschiede zwischen den homodimeren und heterotetrameren Enzymen gibt es eine 37%ige Identität zwischen den P-Proteinen aus *Synechocystis* und *T. thermophilus* (Hasse *et al.*, 2010). Dies lässt vermuten, dass es in beiden Enzymen Bereiche mit einer identischen Faltung geben könnte. Aufgrund dessen wurde die Phaseninformation der P-Proteinstruktur aus *T. thermophilus* für ein *molecular replacement* genutzt. Mit den Daten aus den durchgeführten Beugungsexperimenten und den Phaseninformationen des heterotetrameren Enzyms konnte die Struktur des *Synechocystis* P-Proteins aufgeklärt werden (Abb. 61). Dargestellt sind die bisher modellierten Bereiche (ca. 95 %) des cyanobakteriellen P-Proteins. Einige Proteindomänen mit schwachen Beugungsinformationen sind noch nicht sichtbar. Dazu zählen mobile Bereiche des Proteins

in der Nähe des aktiven Zentrums sowie einige Teile an der Oberfläche des Proteins (I. Andersson, mündl. Mitteilg.).

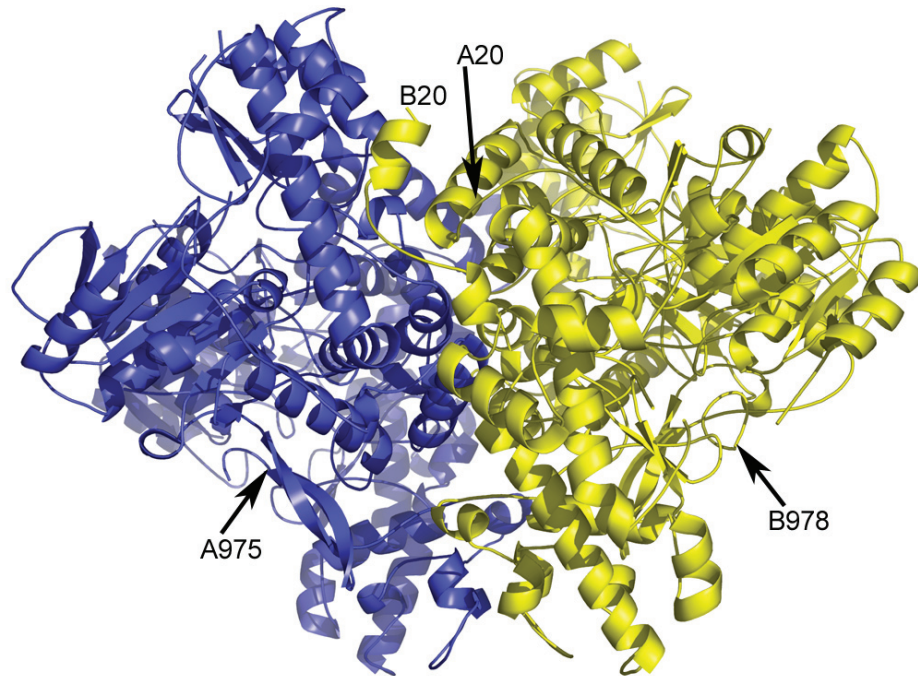


Abb. 61: Strukturmodell des homodimeren P-Proteins aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Beide Monomere sind mit unterschiedlichen Farben markiert. Der N- und C-Terminus beider Untereinheiten wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Durch das noch nicht vollständig durchgeführte *refinement* des Proteins kann die Auswertung der P-Protein-Struktur noch nicht im Detail erfolgen. Dennoch lassen sich bereits Aussagen treffen und Vergleiche mit der Struktur aus *T. thermophilus* durchführen. Eindeutig sichtbar ist der homodimere Aufbau des cyanobakteriellen Enzyms (Abb. 61). Beide Untereinheiten interagieren in einem großen Bereich entlang der Symmetrieachse miteinander. Damit wird deutlich, dass homodimere P-Proteine nur als Dimer löslich vorkommen können.

Wie bereits erwähnt, ist das P-Protein ein PLP-abhängiges Enzym. Diese werden in die Faltungstypklassen (I-V) eingeteilt, wobei das P-Protein aufgrund von Sequenzhomologien zur Klasse 1 zu zählen ist (Grishin *et al.*, 1995, Jansonius, 1998, Mehta & Christen, 2000). Die Enzyme dieser Faltungsklasse wurden bisher immer als Homodimer beschrieben. Die α - und β -Untereinheiten der tetrameren Proteine weisen starke Sequenzähnlichkeiten zu den N-terminalen bzw. C-terminalen Bereichen der aus nur einer Untereinheit bestehenden Proteine auf. Auch untereinander sind die α - und β -Untereinheiten mit einer Identität von 26 % sehr ähnlich. Deshalb wird postuliert, dass beide Untereinheiten durch Genspaltung und anschließende Veränderung entstanden sind. Dies ging mit dem Verlust eines aktiven Zentrums in der α -Untereinheit einher (Andreesen, 1994, Nakai *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur des aus einem $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer bestehenden P-Proteins wird deshalb auch als

Homotetramer und nicht als Heterotetramer bezeichnet (Nakai *et al.*, 2003, Nakai *et al.*, 2005).

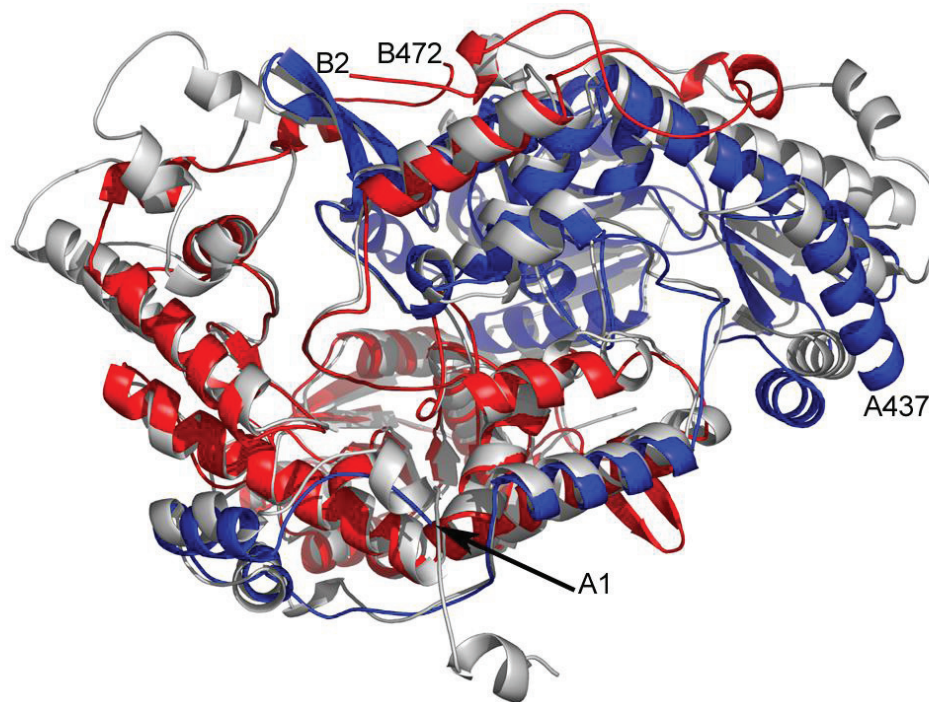


Abb. 62: Überlagerung der Strukturen eines Monomers des P-Proteins aus *Synechocystis* (grau) sowie eines $\alpha_1\beta_1$ -Dimers des Enzyms aus *T. thermophilus* (α : blau; β : rot). Die N- und C-terminalen Enden der Proteinuntereinheiten aus *T. thermophilus* sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die Abb. 62 zeigt einen Vergleich der Strukturen eines P-Protein-Monomers des *Synechocystis* Enzyms mit einem $\alpha_1\beta_1$ -Dimer des P-Proteins aus *T. thermophilus*. Wie bereits vermutet wurde, gibt es in beiden Proteinen Bereiche mit nahezu identischer Faltung. Dazu gehören vor allem die zentralen Teile des Proteins, die das aktive Zentrum beinhalten. Beide Proteine katalysieren *in vivo* in Gegenwart des H-Proteins die Decarboxylierung von Glycin. Dies erklärt trotz der relativ großen phylogenetischen Unterschiede eine ähnliche Faltung der aktiven Zentren beider Enzyme. Bei einer genaueren Betrachtung sieht man im zentralen Bereich jedoch auch leichte Differenzen in der Orientierung sowie der Länge einiger Helices. Größere Unterschiede gibt es in den äußeren Bereichen beider Proteine. Dazu gehören wiederum Differenzen in der Orientierung und Länge einzelner Helices. Besonders sticht hervor, dass das cyanobakterielle P-Protein einige zusätzliche äußere *loops* besitzt, welche dem Enzym aus *T. thermophilus* fehlen. Das C-terminale Ende der α -Untereinheit (A437, Abb. 62) sowie der N-Terminus der β -Untereinheit (B2, Abb. 62) liegen beim *T. thermophilus* P-Protein weit auseinander. Aufgrund des homodimeren Aufbaus wird dieser Bereich beim *Synechocystis* Enzym durch einen *loop* verbunden. Dies erklärt ebenso, dass die homodimeren P-Proteine mehr Aminosäuren und damit eine etwas größere molekulare Masse besitzen (Tabelle 38).

Das tetramere P-Protein aus *T. thermophilus* besitzt zwei aktive Zentren, die jeweils an der Grenzfläche zwischen der α - und β -Untereinheit lokalisiert sind. Der Boden der aktiven Zentren wird hauptsächlich durch Aminosäuren der β -Untereinheit (Gly^{570 β} , Ala^{571 β} , Glu^{574 β} , His^{604 β} , Ser^{606 β} , Thr^{648 β} , Thr^{652 β} , Asp^{677 β} , Ala^{679 β} , Asn^{680 β} , His^{699 β} , Asn^{701 β} , His^{703 β} und Lys^{704 β}), der obere Bereich hingegen nur von einer kleinen Domäne der β -Untereinheit (Ser^{511 β} und Cys^{512 β}) und einer großen Domäne der α -Untereinheit (Tyr^{95 α} , Thr^{96 α} , Tyr^{98 α} , Gln^{308 α} , Tyr^{309 α} , Thr^{320 α} und Thr^{321 α}) gebildet. Diese Bereiche sind bei allen Pro- und Eukaryoten hoch konserviert (Nakai *et al.*, 2005). Die prosthetische Gruppe PLP tritt durch extensive nichtkovalente Bindungen mit den Aminosäureresten der aktiven Zentren in Wechselwirkung und ist im aktiven Zustand durch ein internes Aldimin (Schiff'sche Base) mit einem hoch konservierten Lysinrest verbunden. Die Phosphatgruppe des PLP ist in einer Vielzahl von Wasserstoffbrücken und Ionenpaarungen involviert und fixiert so den PLP im aktiven Zentrum (Nakai *et al.*, 2005). Besonders wichtig für die Fixierung des PLP sind einige Aminosäuren des oberen Teils vom aktiven Zentrum (Tyr^{95 α} , Thr^{320 α} , Thr^{321 α}). Dieser Bereich ist in der Abb. 63 dargestellt. Das Thr^{320 α} des *T. thermophilus* P-Proteins ist in den homodimeren P-Proteinen der Cyanobakterien und Eukaryoten durch ein Cystein substituiert (Abb. 63). Die Positionen des für die PLP-Bindung essenziellen Lysins sowie der stabilisierenden Aminosäuren sind verglichen mit dem heterotetrameren P-Protein nahezu identisch.

Die abschließende Auswertung der Beugungsdaten wird weitere Vergleiche mit dem Enzym aus *T. thermophilus* zulassen. Dies wird weitere Einblicke in die Funktionsweise und Regulation eukaryotischer P-Proteine ermöglichen.

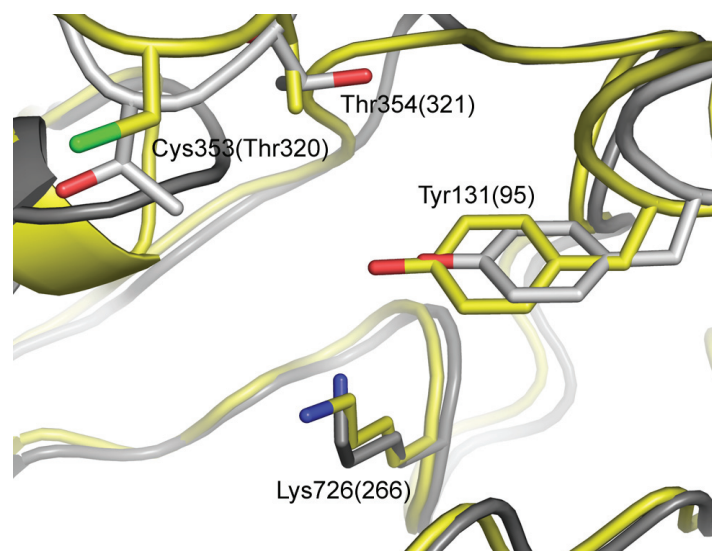


Abb. 63: Vergleich der aktiven Zentren der P-Proteine aus *Synechocystis* (gelb) und *T. thermophilus* (grau) mit dem konservierten Lysinrest und den Aminosäuren Cys³⁵³, Thr³⁵⁴ und Tyr¹³¹.

7. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war die biochemische und strukturelle Charakterisierung des P-Proteins aus *Synechocystis*. Dieses Enzym ist Teil des GCS und katalysiert zusammen mit dem H-Protein die Decarboxylierung von Glycin. GCS ist ubiquitär verbreitet. In Prokaryoten ist GCS im Zytosol, in Eukaryoten in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. In Pflanzen nimmt es durch die Beteiligung am photorespiratorischen C₂-Zyklus eine besondere Rolle ein. P-Protein-Mutationen führen in Eukaryoten häufig zu letalen Phänotypen. Menschen mit der Erbkrankheit „nichtketotische Hyperglycinämie“ haben erhöhte Glycinkonzentrationen im Blut und Gehirn. Diese Krankheit wird in 80 % aller bekannten Fälle durch Mutationen des P-Proteins verursacht und endet häufig mit schweren Schädigungen bzw. dem Tod der betroffenen Personen. Daher sind die biochemische Charakterisierung sowie die strukturelle Aufklärung eines eukaryotischen P-Proteins von wissenschaftlichem und praktischem Interesse. Bis heute gelang es jedoch nicht, ein enzymatisch aktives eukaryotisches P-Protein heterolog zu exprimieren. Letzteres ist jedoch Voraussetzung für die Gewinnung ausreichender Proteinmengen zur Durchführung struktureller Untersuchungen. Deshalb wurde in dieser Dissertation das enzymatisch aktive, rekombinante P-Protein aus *Synechocystis* biochemisch und strukturell charakterisiert. Dieses hat wie alle eukaryotischen P-Proteine einen homodimeren Aufbau und ist phylogenetisch mit den pflanzlichen und tierischen P-Proteinen nah verwandt.

Die mit dem rekombinanten P-Protein aus *Synechocystis* erhaltenen biochemischen Werte ähneln denen anderer pro- und eukaryotischer P-Proteine (Hasse *et al.*, 2007). Besonders bemerkenswert ist die Übereinstimmung der biochemischen Parameter mit dem P-Protein aus *P. sativum*. Dies unterstreicht wiederum die These, dass alle heutigen pflanzlichen P-Proteine von dem cyanobakteriellen Endosymbionten abstammen könnten. Neben dem *Synechocystis* H-Protein kann das Enzym auch viele weitere pro- und eukaryotische H-Proteine als Substrat verwenden. Dies unterstreicht wiederum die Eignung dieses Enzyms als Modellprotein zur Charakterisierung aller P-Proteine mit homodimerem Aufbau sowie deren Interaktion mit weiteren GCS-Proteinen. Während der Interaktionsstudien mit eukaryotischen H-Proteinen wurde festgestellt, dass die durch alternatives Spleißen gebildeten H-Proteine FtGLDH und FtGLDH^{AA} unterschiedliche Substrateigenschaften aufweisen. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass dieser in allen weiter fortgeschrittenen C₄-Arten der Gattung *Flaveria* reguliert durchgeführte Prozess, zu einer Modifikation der P-Protein-Aktivität führt (Hasse *et al.*, 2009). Weiterhin wurden strukturelle Besonderheiten in den verschiedenen H-Proteinen analysiert, die deren Substrateigenschaften sowie das Vorliegen von oligomeren H-Protein-Zuständen erklären könnten.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde das *Synechocystis* P-Protein am BMC in Uppsala, Schweden, kristallisiert. Die erzeugten Kristalle eigneten sich zur Aufnahme von Beugungsdaten mit einer Auflösung von ca. 2,0 Å (Hasse *et al.*, 2010). Durch Nutzung der

Phaseninformation des P-Proteins aus *T. thermophilus* gelang die Auflösung der ersten Struktur eines homodimeren P-Proteins. Im Vergleich mit der bereits publizierten Struktur dieses heterotetrameren P-Proteins ergaben sich strukturelle Ähnlichkeiten im zentralen Bereich der aktiven Zentren. Im äußeren Bereich weisen beide Proteine dagegen große Unterschiede auf.

Da die Struktur und Biochemie des *Synechocystis* P-Proteins denen der eukaryotischen Enzyme außerordentlich ähnlich ist, wurde mit den Ergebnissen dieser Arbeit ein geeignetes Werkzeug für die Untersuchung homodimerer P-Proteine geschaffen. Durch die erhaltene Struktur und die umfassenden biochemischen Datensätze mit sowohl prokaryotischen als auch eukaryotischen H-Proteinen können zukünftig ausführliche Struktur-Funktionsanalysen durchgeführt werden.

8. Literaturverzeichnis

- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W. *et al.*, (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination, *Acta crystallographica* 58, 1948-1954.
- Andersson, I. (2008). Catalysis and regulation in Rubisco, *Journal of experimental botany* 59, 1555-1568.
- Andreesen, J. R. (1994). Glycine metabolism in anaerobes, *Antonie van Leeuwenhoek* 66, 223-237.
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K. *et al.*, (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2642-2647.
- Bauwe, H. & Chollet, R. (1986). Kinetic Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from C(3), C(4), and C(3)-C(4) Intermediate Species of *Flaveria* (Asteraceae), *Plant Physiol* 82, 695-699.
- Bauwe, H., Chu, C. C., Kopriva, S. *et al.*, (1995). Structure and expression analysis of the *gdc*sPA and *gdc*sPB genes encoding two P-isoproteins of the glycine-cleavage system from *Flaveria pringlei*, *European journal of biochemistry / FEBS* 234, 116-124.
- Bauwe, H. & Kolukisaoglu, U. (2003). Genetic manipulation of glycine decarboxylation, *Journal of experimental botany* 54, 1523-1535.
- Beck, K., Chan, V. C., Shenoy, N. *et al.*, (2000). Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4273-4278.
- Berry, S., Fischer, J. H., Kruip, J. *et al.*, (2005). Monitoring cytosolic pH of carboxysome-deficient cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 using fluorescence analysis, *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 7, 342-347.
- Bourguignon, J., Merand, V., Rawsthorne, S. *et al.*, (1996). Glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria: evidence from mass spectrometry and primary-structure analysis, *The Biochemical journal* 313 (Pt 1), 229-234.
- Bourguignon, J., Neuburger, M. & Douce, R. (1988). Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase, *The Biochemical journal* 255, 169-178.
- Bourguignon, J., Vauclare, P., Merand, V. *et al.*, (1993). Glycine decarboxylase complex from higher plants. Molecular cloning, tissue distribution and mass spectrometry analyses of the T protein, *European journal of biochemistry / FEBS* 217, 377-386.
- Brooks, A. & Farquhar, G. D. (1985). CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light., *Planta* 165, 397-406.
- Burns, G., Brown, T., Hatter, K. *et al.*, (1989). Sequence analysis of the *lpdV* gene for lipoamide dehydrogenase of branched-chain-oxoacid dehydrogenase of *Pseudomonas putida*, *European journal of biochemistry / FEBS* 179, 61-69.

- Campbell, W. J. & Ogren, W. L. (1990). Glyoxylate inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed and reconstituted chloroplasts., *Photosynth. Res.* 23, 257-268.
- Chayen, N. E. (2005). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation, *Progress in biophysics and molecular biology* 88, 329-337.
- Christensen, K. E. & MacKenzie, R. E. (2006). Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals, *Bioessays* 28, 595-605.
- Cohen-Addad, C., Faure, M., Neuburger, M. *et al.*, (1997). Structural studies of the glycine decarboxylase complex from pea leaf mitochondria, *Biochimie* 79, 637-643.
- Cohen-Addad, C., Pares, S., Sieker, L. *et al.*, (1995). The lipoamide arm in the glycine decarboxylase complex is not freely swinging, *Nature structural biology* 2, 63-68.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J. *et al.*, (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393, 537-544.
- Collaborative (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta crystallographica* 50, 760-763.
- D'Arcy, A., Sweeney, A. M. & Haber, A. (2004). Practical aspects of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization, *Methods* (San Diego, Calif 34, 323-328.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T. *et al.*, (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Nature* 392, 353-358.
- Douce, R., Bourguignon, J., Brouquisse, R. *et al.*, (1987). ISOLATION OF PLANT-MITOCHONDRIA - GENERAL-PRINCIPLES AND CRITERIA OF INTEGRITY, *Methods in enzymology* 148, 403-415.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. *et al.*, (2001). The glycine decarboxylase system: a fascinating complex, *Trends in plant science* 6, 167-176.
- Douce, R. & Neuburger, M. (1999). Biochemical dissection of photorespiration, *Current opinion in plant biology* 2, 214-222.
- Ellis, R. J. (1979). The most abundant protein in the world, *Trend in Biochemical Sciences* 4, 241-244.
- Engel, N., van den Daele, K., Kolukisaoglu, U. *et al.*, (2007). Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions, *Plant physiology* 144, 1328-1335.
- Engels, A., Kahmann, U., Ruppel, H. G. *et al.*, (1997). Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, *Biochimica et biophysica acta* 1340, 33-44.
- Flügge, U. I., Freisl, M. & Heldt, H. W. (1980). The mechanism of the control of carbonfixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with acid mediated proton transfer across the envelope., *Planta* 149.

- Freudenberg, W. & Andreesen, J. R. (1989). Purification and partial characterization of the glycine decarboxylase multienzyme complex from *Eubacterium acidaminophilum*, *Journal of bacteriology* 171, 2209-2215.
- Fujiki, Y., Sato, T., Ito, M. *et al.*, (2000). Isolation and characterization of cDNA clones for the e1beta and E2 subunits of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in *Arabidopsis*, *The Journal of biological chemistry* 275, 6007-6013.
- Fujiwara, K. & Motokawa, Y. (1983). Mechanism of the glycine cleavage reaction. Steady state kinetic studies of the P-protein-catalyzed reaction, *The Journal of biological chemistry* 258, 8156-8162.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K. & Motokawa, Y. (1986). Chicken liver H-protein, a component of the glycine cleavage system. Amino acid sequence and identification of the N epsilon-lipoyllysine residue, *The Journal of biological chemistry* 261, 8836-8841.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K. & Motokawa, Y. (1987). Amino acid sequence of the phosphopyridoxyl peptide from P-protein of the chicken liver glycine cleavage system, *Biochemical and biophysical research communications* 149, 621-627.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K. & Motokawa, Y. (1990). cDNA sequence, in vitro synthesis, and intramitochondrial lipoylation of H-protein of the glycine cleavage system, *The Journal of biological chemistry* 265, 17463-17467.
- Fujiwara, K., Okamura, K. & Motokawa, Y. (1979). Hydrogen carrier protein from chicken liver: purification, characterization, and role of its prosthetic group, lipolic acid, in the glycine cleavage reaction, *Archives of biochemistry and biophysics* 197, 454-462.
- Gariboldi, R. T. & Drake, H. L. (1984). Glycine synthase of the purinolytic bacterium, *Clostridium acidurici*. Purification of the glycine-CO₂ exchange system, *The Journal of biological chemistry* 259, 6085-6089.
- Graham, L. A. & Davies, P. L. (2005). Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas, *Science* (New York, N.Y) 310, 461.
- Green, D. E., Morris, T. W., Green, J. *et al.*, (1995). Purification and properties of the lipoate protein ligase of *Escherichia coli*, *The Biochemical journal* 309 (Pt 3), 853-862.
- Grishin, N. V., Phillips, M. A. & Goldsmith, E. J. (1995). Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases, *Protein Sci* 4, 1291-1304.
- Gueguen, V., Macherel, D., Neuburger, M. *et al.*, (1999). Structural and functional characterization of H protein mutants of the glycine decarboxylase complex, *The Journal of biological chemistry* 274, 26344-26352.
- Haas, D. J. & Rossmann, M. G. (1970). Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75 degrees C, *Acta Crystallogr B* 26, 998-1004.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of molecular biology* 166, 557-580.

- Hasse, D., Hagemann, M., Andersson, I. *et al.*, (2010). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analyses of the homodimeric glycine decarboxylase (P-protein) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, Vol. 66, Acta Crystallographica Section F, pp. 187-191.
- Hasse, D., Mikkat, S., Hagemann, M. *et al.*, (2009). Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase, The FEBS journal.
- Hasse, D., Mikkat, S., Thrun, H. A. *et al.*, (2007). Properties of recombinant glycine decarboxylase P- and H-protein subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, FEBS letters 581, 1297-1301.
- Hayasaka, K., Kochi, H., Hiraga, K. *et al.*, (1980). Purification and properties of glycine decarboxylase, a component of the glycine cleavage system, from rat liver mitochondria and immunochemical comparison of this enzyme from various sources, Journal of biochemistry 88, 1193-1199.
- Hiraga, K. & Kikuchi, G. (1980). The mitochondrial glycine cleavage system. Purification and properties of glycine decarboxylase from chicken liver mitochondria, The Journal of biological chemistry 255, 11664-11670.
- Hiraga, K., Kochi, H., Hayasaka, K. *et al.*, (1981). Defective glycine cleavage system in nonketotic hyperglycinemia. Occurrence of a less active glycine decarboxylase and an abnormal aminomethyl carrier protein, The Journal of clinical investigation 68, 525-534.
- Hiraga, K., Kochi, H., Motokawa, Y. *et al.*, (1972). Enzyme complex nature of the reversible glycine cleavage system of cock liver mitochondria, Journal of biochemistry 72, 1285-1289.
- Hope, H. (1990). Crystallography of biological macromolecules at ultra-low temperature, Annual review of biophysics and biophysical chemistry 19, 107-126.
- Jansonius, J. N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes, Curr Opin Struct Biol 8, 759-769.
- Johnson, M. T., Yang, H. S., Magnuson, T. *et al.*, (1997). Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 14512-14517.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. *et al.*, (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, Acta Crystallogr A 47 (Pt 2), 110-119.
- Jordan, S. W. & Cronan, J. E., Jr. (2003). The *Escherichia coli* lipB gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein:protein transferase, Journal of bacteriology 185, 1582-1589.
- Kikuchi, G. (1973). The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance, Molecular and cellular biochemistry 1, 169-187.
- Kikuchi, G. & Hiraga, K. (1982). The mitochondrial glycine cleavage system. Unique features of the glycine decarboxylation, Molecular and cellular biochemistry 45, 137-149.

- Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T. *et al.*, (2008). Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia, *Proceedings of the Japan Academy* 84, 246-263.
- Kim, Y. & Oliver, D. J. (1990). Molecular cloning, transcriptional characterization, and sequencing of cDNA encoding the H-protein of the mitochondrial glycine decarboxylase complex in peas, *The Journal of biological chemistry* 265, 848-853.
- Kishimoto, T., Morihara, Y., Osanai, M. *et al.*, (2005). Synthesis of poly(Pro-Hyp-Gly)(n) by direct poly-condensation of (Pro-Hyp-Gly)(n), where n=1, 5, and 10, and stability of the triple-helical structure, *Biopolymers* 79, 163-172.
- Klein, S. M. & Sagers, R. D. (1962). Intermediary metabolism of *Diplococcus glycinophilus*. II. Enzymes of the acetate-generating system, *Journal of bacteriology* 83, 121-126.
- Klein, S. M. & Sagers, R. D. (1966a). Glycine metabolism. I. Properties of the system catalyzing the exchange of bicarbonate with the carboxyl group of glycine in *Peptococcus glycinophilus*, *The Journal of biological chemistry* 241, 197-205.
- Klein, S. M. & Sagers, R. D. (1966b). Glycine metabolism. II. Kinetic and optical studies on the glycine decarboxylase system from *Peptococcus glycinophilus*, *The Journal of biological chemistry* 241, 206-209.
- Klein, S. M. & Sagers, R. D. (1967). Glycine metabolism. IV. Effect of borohydride reduction on the pyridoxal phosphate-containing glycine decarboxylase from *Peptococcus glycinophilus*, *The Journal of biological chemistry* 242, 301-305.
- Kochi, H. & Kikuchi, G. (1974). Mechanism of the reversible glycine cleavage reaction in *Arthrobacter globiformis*. I. Purification and function of protein components required for the reaction, *Journal of biochemistry* 75, 1113-1127.
- Kochi, H. & Kikuchi, G. (1976). Mechanism of reversible glycine cleavage reaction in *Arthrobacter globiformis*. Function of lipoic acid in the cleavage and synthesis of glycine, *Archives of biochemistry and biophysics* 173, 71-81.
- Kopriva, S. & Bauwe, H. (1995). H-protein of glycine decarboxylase is encoded by multigene families in *Flaveria pringlei* and *F. cronquistii* (Asteraceae), *Mol Gen Genet* 249, 111-116.
- Kopriva, S., Chu, C. C. & Bauwe, H. (1996). H-protein of the glycine cleavage system in *Flaveria*: alternative splicing of the pre-mRNA occurs exclusively in advanced C4 species of the genus, *Plant J* 10, 369-373.
- Kopriva, S., Cossu, R. & Bauwe, H. (1995). Alternative splicing results in two different transcripts for H-protein of the glycine cleavage system in the C4 species *Flaveria trinervia*, *Plant J* 8, 435-441.
- Kopriva, S., Turner, S. R., Rawsthorne, S. *et al.*, (1995). T-protein of the glycine decarboxylase multienzyme complex: evidence for partial similarity to formyltetrahydrofolate synthetase, *Plant molecular biology* 27, 1215-1220.

- Kozaki, A. & Takeba, G. (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation., *Nature* 384, 557-560.
- Ku, M. S., Wu, J., Dai, Z. *et al.*, (1991). Photosynthetic and Photorespiratory Characteristics of Flaveria Species, *Plant Physiol* 96, 518-528.
- Kume, A., Koyata, H., Sakakibara, T. *et al.*, (1991). The glycine cleavage system. Molecular cloning of the chicken and human glycine decarboxylase cDNAs and some characteristics involved in the deduced protein structures, *The Journal of biological chemistry* 266, 3323-3329.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I. *et al.*, (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature* 390, 249-256.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P. *et al.*, (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Leegood, R. C., Lea, P. J., Adcock, M. D. *et al.*, (1995). The regulation and control of photorespiration., *J. Exp. Bot.* 46, 1397-1414.
- Löffler, G. & Petrides, P. E. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag. Heidelberg
- Low, B. W., Chen, C. C., Berger, J. E. *et al.*, (1966). Studies of Insulin Crystals at Low Temperatures: Effects on Mosaic Character and Radiation Sensitivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56, 1746-1750.
- Macherel, D., Bourguignon, J., Forest, E. *et al.*, (1996). Expression, lipoylation and structure determination of recombinant pea H-protein in *Escherichia coli*, *European journal of biochemistry / FEBS* 236, 27-33.
- Macherel, D., Lebrun, M., Gagnon, J. *et al.*, (1990). cDNA cloning, primary structure and gene expression for H-protein, a component of the glycine-cleavage system (glycine decarboxylase) of pea (*Pisum sativum*) leaf mitochondria, *The Biochemical journal* 268, 783-789.
- Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F. *et al.*, (1982). *Molecular cloning : a laboratory manual* / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marti, M. C., Olmos, E., Calvete, J. J. *et al.*, (2009). Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins, *Plant physiology* 150, 646-657.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E. *et al.*, (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12246-12251.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals, *J Mol Biol* 33, 491-497.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D. *et al.*, (2007). Phaser crystallographic software, *Journal of applied crystallography* 40, 658-674.

- Mehta, P. K. & Christen, P. (2000). The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 74, 129-184.
- Miles, J. S. & Guest, J. R. (1987). Subgenes expressing single lipoyl domains of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*, *The Biochemical journal* 245, 869-874.
- Miller, J. R., Busby, R. W., Jordan, S. W. *et al.*, (2000). *Escherichia coli* LipA is a lipoyl synthase: in vitro biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein, *Biochemistry* 39, 15166-15178.
- Moore, A. L., Jackson, C., Halliwell, B. *et al.*, (1977). Intramitochondrial localisation of glycine decarboxylase in spinach leaves, *Biochemical and biophysical research communications* 78, 483-491.
- Morris, T. W., Reed, K. E. & Cronan, J. E., Jr. (1995). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein, *Journal of bacteriology* 177, 1-10.
- Motokawa, Y. & Kikuchi, G. (1969). Glycine metabolism by rat liver mitochondria. II. Methylene tetrahydrofolate as the direct on carbon donor in the reaction of glycine synthesis, *Journal of biochemistry* 65, 71-75.
- Motokawa, Y. & Kikuchi, G. (1971). Glycine metabolism in rat liver mitochondria. V. Intramitochondrial localization of the reversible glycine cleavage system and serine hydroxymethyltransferase, *Archives of biochemistry and biophysics* 146, 461-464.
- Motokawa, Y. & Kikuchi, G. (1974). Glycine metabolism by rat liver mitochondria. Reconstruction of the reversible glycine cleavage system with partially purified protein components, *Archives of biochemistry and biophysics* 164, 624-633.
- Motokawa, Y., Kikuchi, G., Narisawa, K. *et al.*, (1977). Reduced level of glycine cleavage system in the liver of hyperglycinemia patients, *Clin Chim Acta* 79, 173-181.
- Mouillon, J. M., Aubert, S., Bourguignon, J. *et al.*, (1999). Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism, *Plant J* 20, 197-205.
- Mukherjee, M., Brown, M. T., McArthur, A. G. *et al.*, (2006). Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*, *Eukaryotic cell* 5, 2062-2071.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta crystallographica* 53, 240-255.
- Nakai, T., Ishijima, J., Masui, R. *et al.*, (2003). Structure of *Thermus thermophilus* HB8 H-protein of the glycine-cleavage system, resolved by a six-dimensional molecular-replacement method, *Acta crystallographica* 59, 1610-1618.
- Nakai, T., Nakagawa, N., Maoka, N. *et al.*, (2005). Structure of P-protein of the glycine cleavage system: implications for nonketotic hyperglycinemia, *The EMBO journal* 24, 1523-1536.
- Neuburger, M., Polidori, A. M., Pietre, E. *et al.*, (2000). Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase

- multienzyme system. 1. Biochemical studies, European journal of biochemistry / FEBS 267, 2882-2889.
- Nzila, A., Ward, S. A., Marsh, K. *et al.*, (2005). Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargated or specific to Plasmodium, Trends in parasitology 21, 334-339.
- Okamura-Ikeda, K., Ohmura, Y., Fujiwara, K. *et al.*, (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the Escherichia coli glycine-cleavage system, European journal of biochemistry / FEBS 216, 539-548.
- Oliver, D. J. (1994). The Glycine Decarboxylase Complex from Plant Mitochondria, Vol. 45, pp. 323-337.
- Oliver, D. J., Neuburger, M., Bourguignon, J. *et al.*, (1990). Interaction between the Component Enzymes of the Glycine Decarboxylase Multienzyme Complex, Plant physiology 94, 833-839.
- Oliver, D. J. & Raman, R. (1995). Glycine decarboxylase: protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria, Journal of bioenergetics and biomembranes 27, 407-414.
- Osmond, C. B. & Harris, B. (1971). Photorespiration during C 4 photosynthesis, Biochimica et biophysica acta 234, 270-282.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, Vol. 276, Macromolecular Crystallography, Pt A, pp. 307-326. San Diego: Academic Press Inc.
- Page, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers, Comput Appl Biosci 12, 357-358.
- Palmieri, M. C., Lindermayr, C., Bauwe, H. *et al.*, (2010). Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation, Plant physiology.
- Pares, S., Cohen-Addad, C., Sieker, L. *et al.*, (1994). X-ray structure determination at 2.6-Å resolution of a lipoate-containing protein: the H-protein of the glycine decarboxylase complex from pea leaves, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 4850-4853.
- Pares, S., Cohen-Addad, C., Sieker, L. C. *et al.*, (1995). Refined structures at 2 and 2.2 Å resolution of two forms of the H-protein, a lipoamide-containing protein of the glycine decarboxylase complex, Acta crystallographica 51, 1041-1051.
- Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement, Nature structural biology 6, 458-463.
- Portis, A. R., Jr. & Parry, M. A. (2007). Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective, Photosynthesis research 94, 121-143.
- Rajinikanth, M., Harding, S. A. & Tsai, C. J. (2007). The glycine decarboxylase complex multienzyme family in Populus, Journal of experimental botany 58, 1761-1770.
- Raven, J. A. (2006). Sensing inorganic carbon: CO₂ and HCO₃, Biochem J 396, e5-7.

- Rebeille, F., Neuburger, M. & Douce, R. (1994). Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria, *Biochem J* 302 (Pt 1), 223-228.
- Reed, K. E. & Cronan, J. E., Jr. (1993). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: sequencing and functional characterization of the *lipA* and *lipB* genes, *Journal of bacteriology* 175, 1325-1336.
- Reumann, S. & Weber, A. P. (2006). Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain, *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1496-1510.
- Robinson, J. R., Klein, S. M. & Sagers, R. D. (1973). Glycine metabolism. Lipoic acid as the prosthetic group in the electron transfer protein P2 from *Peptococcus glycinophilus*, *The Journal of biological chemistry* 248, 5319-5323.
- Sage, R. F. (2004). The evolution of C4 photosynthesis, *New Phytologist* 161, 341-370.
- Sagers, R. D., Benziman, M. & Gunsalus, I. C. (1961). Acetate formation in *Clostridium acidurici*: acetokinase, *Journal of bacteriology* 82, 233-238.
- Sarojini, G. & Oliver, D. J. (1983). Extraction and Partial Characterization of the Glycine Decarboxylase Multienzyme Complex from Pea Leaf Mitochondria, *Plant physiology* 72, 194-199.
- Sarojini, G. & Oliver, D. J. (1985). Inhibition of Glycine Oxidation by Carboxymethoxylamine, Methoxylamine, and Acethydrazide, *Plant physiology* 77, 786-789.
- Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE, *Nat Protoc* 1, 16-22.
- Schwarte, S. & Bauwe, H. (2007). Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*, *Plant physiology* 144, 1580-1586.
- Serrano, A. (1992). Purification, characterization and function of dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain P.C.C. 7119, *The Biochemical journal* 288 (Pt 3), 823-830.
- Sokatch, J. R. & Burns, G. (1984). Oxidation of glycine by *Pseudomonas putida* requires a specific lipoamide dehydrogenase, *Archives of biochemistry and biophysics* 228, 660-666.
- Somerville, C. R. (2001). An early *Arabidopsis* demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration, *Plant physiology* 125, 20-24.
- Somerville, C. R. & Ogren, W. L. (1982). Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity, *The Biochemical journal* 202, 373-380.
- Stauffer, G. V., Stauffer, L. T. & Plamann, M. D. (1989). The *Salmonella typhimurium* glycine cleavage enzyme system, *Mol Gen Genet* 220, 154-156.
- Tait, G. H. (1970). Glycine decarboxylase in *Rhodospseudomonas spheroides* and in rat liver mitochondria, *The Biochemical journal* 118, 819-830.

- Timm, S., Nunes-Nesi, A., Parnik, T. *et al.*, (2008). A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis, *Plant Cell* 20, 2848-2859.
- Tolbert, N. E. (1997). The C₂ Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle, *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 48, 1-25.
- Turner, S. R., Hellens, R., Ireland, R. *et al.*, (1993). The organisation and expression of the genes encoding the mitochondrial glycine decarboxylase complex and serine hydroxymethyltransferase in pea (*Pisum sativum*), *Mol Gen Genet* 236, 402-408.
- Voll, L. M., Jamaï, A., Renne, P. *et al.*, (2006). The photorespiratory Arabidopsis *shml* mutant is deficient in SHM1, *Plant physiology* 140, 59-66.
- Walker, J. L. & Oliver, D. J. (1986). Glycine decarboxylase multienzyme complex. Purification and partial characterization from pea leaf mitochondria, *The Journal of biological chemistry* 261, 2214-2221.
- Wilson, R. L., Stauffer, L. T. & Stauffer, G. V. (1993). Roles of the GcvA and PurR proteins in negative regulation of the Escherichia coli glycine cleavage enzyme system, *Journal of bacteriology* 175, 5129-5134.
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P. *et al.*, (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection, *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 355, 1517-1529.
- Woo, K. C. & C.B., O. (1977). Participation of leaf mitochondria in the photorespiratory carbon oxidation cycle: glycine decarboxylation activity in leaf mitochondria from different species and its intramitochondrial location., *Japan Soc Plant Physiol* 315-323.
- Yasuno, R. & Wada, H. (2002). The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in Arabidopsis thaliana, *FEBS letters* 517, 110-114.
- Zelitch, I., Schultes, N. P., Peterson, R. B. *et al.*, (2009). High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air, *Plant physiology* 149, 195-204.
- Zindel, U., Freudenberg, W., Rieth, M. *et al.*, (1988). Eubacterium-Acidaminophilum Sp-Nov, a Versatile Amino Acid-Degrading Anaerobe Producing or Utilizing H₂ or Formate - Description and Enzymatic Studies, *Archives of Microbiology* 150, 254-266.

Properties of recombinant glycine decarboxylase P- and H-protein subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803

Dirk Hasse^a, Stefan Mikkat^b, Hans-Albrecht Thrun^a, Martin Hagemann^a, Hermann Bauwe^{a,*}

^a Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzenphysiologie, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

^b Universität Rostock, Medizinische Fakultät, Core Facility Proteomanalytik, Schilling-Allee 69, D-18057 Rostock, Germany

Received 23 December 2006; revised 15 February 2007; accepted 16 February 2007

Available online 28 February 2007

Edited by Ulf-Ingo Flügge

Abstract The multi-enzyme complex glycine decarboxylase is important for one-carbon metabolism, essential for the photorespiratory glycolate cycle of plants, and comprises four different polypeptides, P-, H-, T-, and L-protein. We report on the production and properties of recombinant P-protein from the cyanobacterium *Synechocystis* and also describe features of recombinant H-protein from the same organism. The P-protein shows enzymatic activity with lipoylated H-protein and very low activity with H-apoprotein or lipoate as artificial cofactors. Its affinity towards glycine is unaffected by the presence and nature of the methyleneamine acceptor molecule. The cyanobacterial H-protein apparently forms stable dimers.

© 2007 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Glycine decarboxylase; P-protein; H-protein; Cyanobacteria; *Synechocystis*

1. Introduction

Glycine decarboxylase (GDC) is a multi-enzyme complex which cooperates with serine hydroxymethyltransferase (SHMT) in the reversible glycine–serine interconversion [1], which is essential for carbon acquisition in methylotrophic prokaryotes and one-carbon metabolism of eukaryotes. In eukaryotes, GDC occurs only in mitochondria while SHMT-isoforms are also present outside this organelle. The GDC-catalyzed oxidative decarboxylation of glycine is accompanied by the methenylation of tetrahydrofolate (THF) to CH₂-THF, an important one-carbon donor. GDC and SHMT are also essential enzymes for the plant photorespiratory C₂-cycle. This high-throughput pathway salvages 2-phosphoglycolate synthesized by Rubisco thus being a vital auxiliary mechanism that enables plants to live in an oxygen-containing atmosphere. It is hence not surprising that defects in GDC result in serious metabolic disturbances in all eukaryotes. GDC mutations in humans, e.g., cause the yet un-curable genetic disease non-ketotic hyperglycinemia [2] and plants with strongly reduced

levels of GDC [3] or SHMT [4] cannot survive in normal air. Cyanobacteria possess a carbon-concentrating mechanism that reduces, but not abolishes, photorespiratory processes. While deletion of GDC results in distinct glycine accumulation, these photosynthetic bacteria are more flexible than plants and can survive without GDC [5]. This is due to the additional presence of a bacterial-like glycerate pathway, which can bypass several enzymatic reactions of the photorespiratory C₂-cycle including the GDC-catalysed reaction [6].

The complete GDC reaction cycle requires three different enzymes, P-, T-, and L-protein, and a small lipoylated aminomethylene carrier protein [reviewed in [1]]. The protein-bound lipoic acid of this latter protein, H-protein, plays a key role as both electron acceptor and aminomethyl carrier when it interacts as a mobile substrate one after the other with P-, T-, and L-protein. The pyridoxalphosphate-containing P-protein is the actual glycine-decarboxylating subunit; CO₂ is released and the remaining aminomethylene group becomes bound to the oxidized lipoamide arm of H-protein. Next, T-protein liberates NH₃ from the H-protein-bound aminomethylene moiety and transfers the methylene group to THF to yield CH₂-THF. The then fully reduced lipoamide group of H-protein is finally reoxidized by L-protein, an NAD⁺-dependent lipoamide dehydrogenase, under simultaneous production of NADH [7].

Although a stoichiometry of 4 P-protein:27 H-protein:9 T-protein:2 L-protein has been determined [8], the detailed structure of the multi-enzyme complex is not known. Stable P₂H₂ [9] and T₁H₁ [10] associations have been demonstrated, but structural interaction between H- and L-protein does not occur [11]. Moreover, crystal structures for eukaryotic H- [12], L- [13], and T-protein [14] have been obtained. All these studies employed recombinant overexpression systems to obtain the necessary amounts of purified protein. Such data are not yet available for P-protein from eukaryotic sources but only from the eubacterium *Thermus thermophilus* [15]. It is hypothesized that this prokaryotic (α^Nβ^C)₂-tetrameric P-protein and the eukaryotic α₂-type dimeric P-protein share a similar three-dimensional structure; however, for unclear reasons, recombinant overexpression of eukaryotic P-protein is difficult to achieve (unpublished data from our laboratory).

Cyanobacteria are the ancestors of plant chloroplasts and delivered many genes to plant genomes [16]. In contrast to the *T. thermophilus* protein, cyanobacterial P-protein does not comprise two subunits and is thus better comparable to its eukaryotic homologs. Here, we report a method to produce large amounts of highly purified recombinant cyanobacterial

*Corresponding author. Fax: +49 (0) 3814986112.

E-mail address: hermann.bauwe@uni-rostock.de (H. Bauwe).

Abbreviations: GDC, glycine decarboxylase; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; THF, tetrahydrofolate



Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase

Dirk Hasse¹, Stefan Mikkat², Martin Hagemann¹ and Hermann Bauwe¹

¹ Department of Plant Physiology, University of Rostock, Germany

² Core Facility Proteome Analysis, Medical Faculty, University of Rostock, Germany

Keywords

alternative splicing; glycine decarboxylase; H-protein; photorespiration

Correspondence

H. Bauwe, Department of Plant Physiology, University of Rostock, Albert-Einstein-Straße 3, D-18059 Rostock, Germany
Fax: +49 381 498 6112
Tel: +49 381 498 6110
E-mail: hermann.bauwe@uni-rostock.de
Website: <http://www.biologie.uni-rostock.de/pflanzenphysiologie>

(Received 7 July 2009, revised 5 September 2009, accepted 25 September 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07406.x

Several thousand plant genes are known to produce multiple transcripts, but the precise function of most of the alternatively encoded proteins is not known. Alternative splicing has been reported for the H-protein subunit of glycine decarboxylase in the genus *Flaveria*. H-protein has no catalytic activity itself but is a substrate of the three enzymatically active subunits, P-, T- and L-protein. In *C₄* species of *Flaveria*, two H-proteins originate from single genes in an organ-dependent manner. Here, we report on differences between the two alternative H-protein variants with respect to their interaction with the glycine-decarboxylating subunit, P-protein. Steady-state kinetic analyses of the alternative *Flaveria* H-proteins and artificially produced 'alternative' Arabidopsis H-proteins, using either pea mitochondrial matrix extracts or recombinant cyanobacterial P-protein, consistently demonstrate that the alternative insertion of two alanine residues at the N-terminus of the H-protein elevates the activity of P-protein by 20% *in vitro*, and could promote glycine decarboxylase activity *in vivo*.

Introduction

Several thousand plant genes are known to produce multiple transcripts, but the precise function of most of the alternatively encoded proteins is not known [1]. Alternative splicing has also been observed for H-protein, a component of the ubiquitous multi-enzyme system glycine decarboxylase (GDC, EC 1.4.4.2) [2,3]. GDC is essential for photorespiratory and one-carbon metabolism, and the vital function of this enzyme complex is indicated by the fact that its inactivation is fatal to plants [4] and animals [5].

The GDC H-protein (GLDH) has no catalytic activity itself but interacts via its lipoyl arm one after the other with the three other GDC subunits, P-, T- and L-protein. As a result of the GDC reaction cycle, which requires the coenzymes NAD⁺ and tetrahydro-

folate, methylene-tetrahydrofolate and NADH are generated and CO₂ and NH₃ are released [6].

Plant H-proteins are often encoded by small multi-gene families, and the individual H-proteins supposedly fulfil various functions in plant metabolism [7–9]. Some plants, however, harbour only one H-protein gene, and we have previously reported that *C₄* species of the genus *Flaveria* produce two H-proteins in an organ-dependent manner by alternative 3' splice site selection [2,10]. The alternatively encoded H-protein, FtGLDH^{AA}, harbours two additional alanine residues very close to its N-terminus, and is by far the most dominant H-protein type in leaf mitochondria of these plants. Because of photorespiratory metabolism, leaf mitochondria contain much more GDC than root

Abbreviations

GDC, glycine decarboxylase; GLDH, GDC H-protein; GLDH^{AA}, alternative H-protein; LpIA, lipoate–protein ligase.

crystallization communications

Acta Crystallographica Section F

Structural Biology
and Crystallization
Communications

ISSN 1744-3091

**Dirk Hasse,^a Martin Hagemann,^a
Inger Andersson^{b*} and Hermann
Bauwe^{a*}**^aDepartment of Plant Physiology, University of
Rostock, Germany, and ^bDepartment of
Molecular Biology, Swedish University of
Agricultural Sciences, Box 590,
S-751 24 Uppsala, SwedenCorrespondence e-mail: inger@xray.bmc.uu.se,
hermann.bauwe@uni-rostock.de

Received 30 October 2009

Accepted 8 December 2009

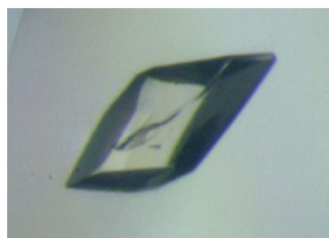
**Crystallization and preliminary X-ray diffraction
analyses of the homodimeric glycine decarboxylase
(P-protein) from the cyanobacterium *Synechocystis*
sp. PCC 6803**

Glycine decarboxylase, or P-protein, is a major enzyme that is involved in the C₁ metabolism of all organisms and in the photorespiratory pathway of plants and cyanobacteria. The protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a homodimer with a mass of 215 kDa. Recombinant glycine decarboxylase was expressed in *Escherichia coli* and purified by metal-affinity, ion-exchange and gel-filtration chromatography. Crystals of P-protein that diffracted to a resolution of 2.1 Å were obtained using the hanging-drop vapour-diffusion method at 291 K. X-ray diffraction data were collected from cryocooled crystals using synchrotron radiation. The crystals belonged to space group *P*2₁2₁2₁, with unit-cell parameters *a* = 96.30, *b* = 135.81, *c* = 179.08 Å.

1. Introduction

Glycine decarboxylase (EC 1.4.4.2), or P-protein, is part of the glycine-cleavage system (GCS), which is widely distributed in bacteria, plants and animals. The GCS cooperates with serine hydroxymethyltransferase in the reversible glycine–serine interconversion (Douce *et al.*, 2001) and catalyses the oxidative cleavage of glycine to CO₂, NH₄⁺ and a methylene group (–CH₂–) in a multistep reaction. The methylene group is accepted by tetrahydrofolate to yield methylene tetrahydrofolate, a major cofactor in one-carbon metabolism. Hence, it is not surprising that defects in the GCS result in serious metabolic disturbances in eukaryotes. In humans, absence of glycine decarboxylase activity results in an enhanced accumulation of glycine in the blood, leading to nonketotic hyperglycinaemia. This disease is often caused by mutations in the P-protein subunit (Kume *et al.*, 1988; Kure *et al.*, 1998). The GCS is also essential in the plant photorespiratory C₂ cycle, which salvages 2-phosphoglycolate resulting from the oxygenation reaction catalysed by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) under atmospheric conditions. In *Arabidopsis thaliana* lack of P-protein also causes lethality under nonphotorespiratory conditions, underlining the fact that GCS activity is also essential for plant C₁ metabolism (Engel *et al.*, 2007). Cyanobacteria possess a carbon-concentrating mechanism that reduces but does not abolish photorespiration (Eisenhut *et al.*, 2008). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 GCS deletion leads to glycine accumulation. However, because of its greater metabolic flexibility this organism can survive without a GCS (Hagemann *et al.*, 2005; Eisenhut *et al.*, 2006).

The complete GCS reaction cycle requires the cooperation of three different enzymes (P-protein, T-protein and L-protein) and the small heat-stable H-protein. The latter acts as an electron acceptor and an aminomethyl carrier and functions as a mobile substrate of P-protein, T-protein and L-protein. P-protein is the actual glycine-decarboxylating enzyme and uses pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as a cofactor; CO₂ is released in the reaction and the residual aminomethyl group is bound to the oxidized lipoamide arm of H-protein. Next, T-protein or aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10) catalyzes the transfer of the methylene group from the H-protein-bound aminomethyl moiety to tetrahydrofolate. T-protein releases NH₃ and regenerates the fully

© 2010 International Union of Crystallography
All rights reserved

9.4. Klonierte Plasmide

9.4.1. Expressionsplasmide mit Basis pBAD-HisA

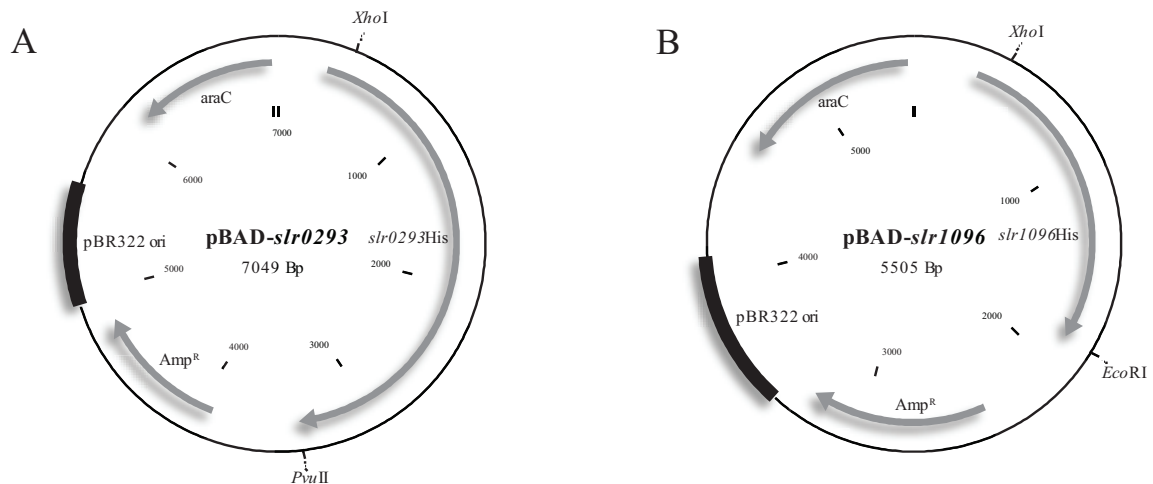
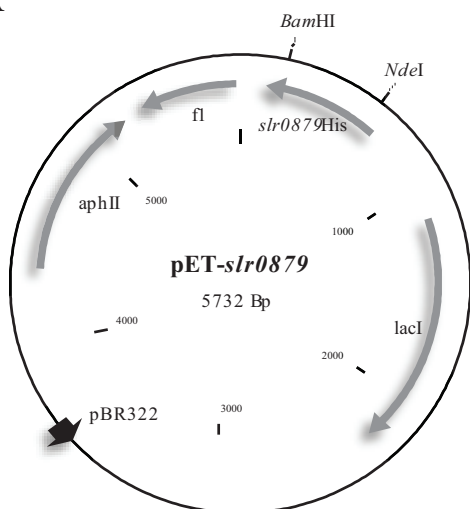


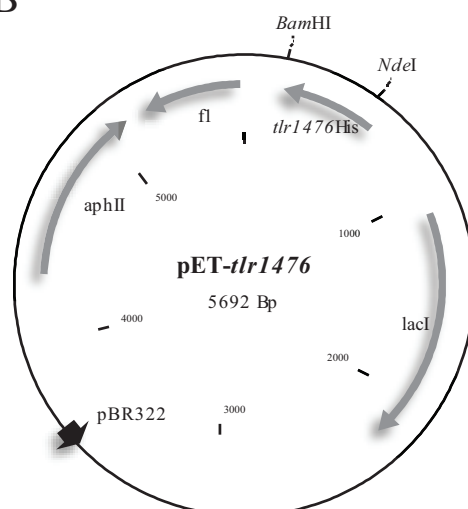
Abb. 64: Expressionsplasmide pBAD-slz0293 und pBAD pBAD-slz1096. Dargestellt sind die Expressionsplasmide pBAD-slz0293 (A) und pBAD pBAD-slz1096 (B). In Plasmid A wurde das Gen für das P-Protein aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*slz0293*) über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Pvu*II in die MCS kloniert. Plasmid B beinhaltet das Gen für das L-Protein aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*slz1096*), welches über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Eco*RI in die MCS kloniert wurde. Über die vorhandene Antibiotika-Resistenz (Amp^R) und den mit *E. coli* kompatiblen *origin* (pBR322) werden beide Plasmide stabil im Wirtsorganismus repliziert. Bei beiden Plasmiden sind die Gene mit einem N-terminalen Polyhistidin-Tag fusioniert, der eine Aufreinigung über IMAC ermöglicht. Die Induktion der Expression erfolgt durch Zusatz von 0,02% Arabinose zum Kultivierungsmedium.

9.4.2. Expressionsplasmide mit Basis pET-28a

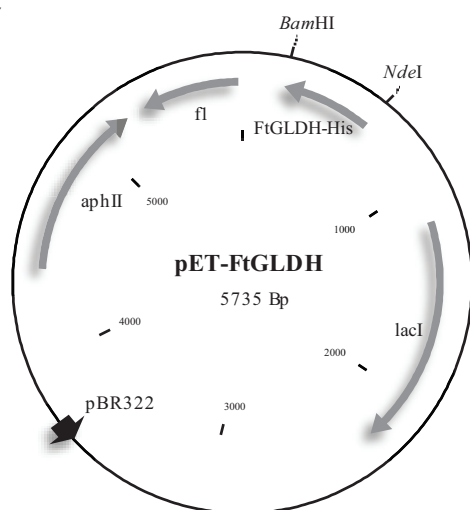
A



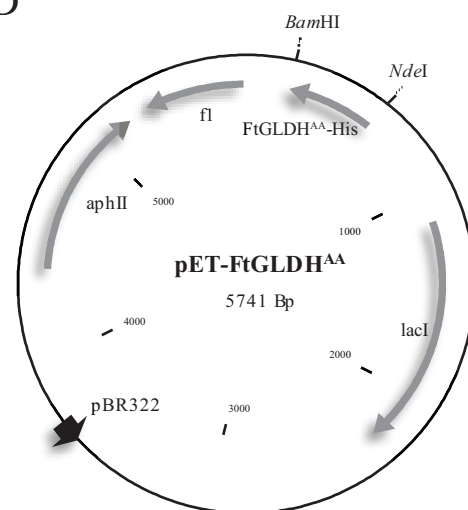
B



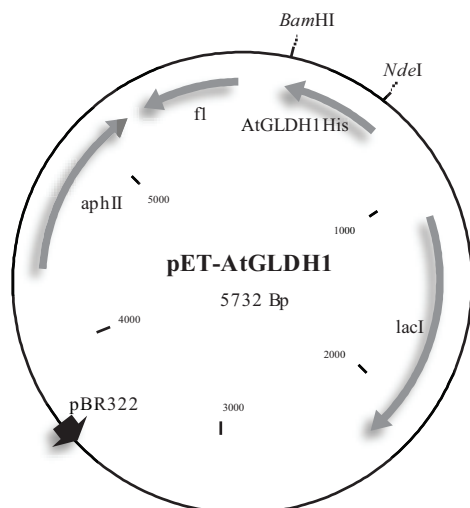
C



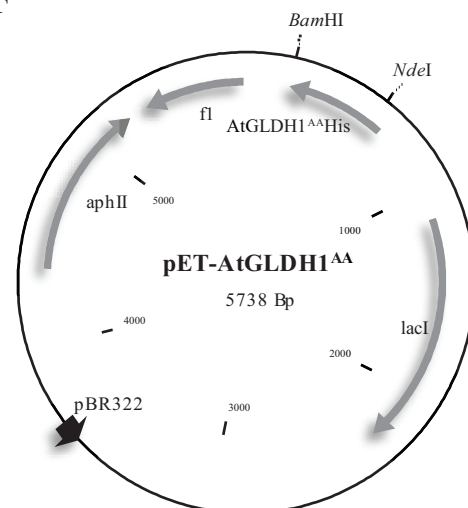
D



E



F



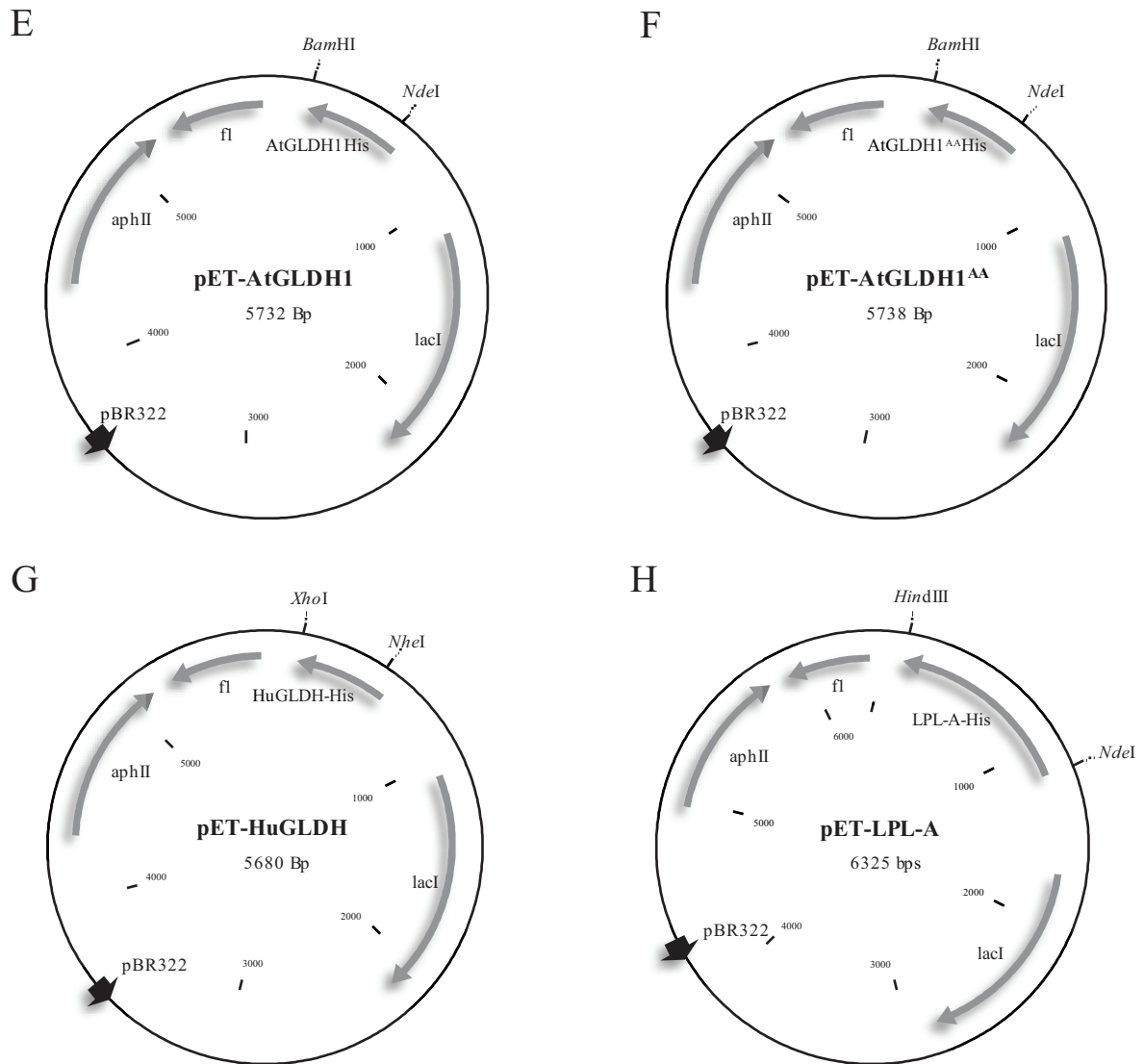


Abb. 65: Expressionsplasmide pET-sl0879, pET-tlr1476, pET-FtGLDH, pET-FtGLDH^{AA}, pET-AtGLDH1, pET-AtGLDH1^{AA}, pET-HuGLDH und pET-LPL-A. In die Plasmide A-G wurden H-Proteine unterschiedlicher Herkunft über *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen (A-F) bzw. *NheI* und *XhoI* in die MCS von pET28a kloniert. In Plasmid A befindet sich das Gen *slr0879* aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Das Expressionsplasmid pET-tlr1476 beinhaltet das H-Protein-Gen aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (*tlr1476*). Die Plasmide C und D enthalten die beiden H-Proteine aus *Flaveria trinervia*. Diese Pflanze gehört zu den C₄-Arten der Gattung *Flaveria*. Der inserierte *open reading frame* (ORF) in Plasmid C kodiert für das kürzere H-Protein (FtGLDH), während Plasmid D die kodierende Sequenz des H-Proteins FtGLDH^{AA} beinhaltet. Letzteres unterscheidet sich von FtGLDH nur durch die Insertion von zwei zusätzlichen Alanin-Molekülen nach den ersten beiden Serin-Molekülen am N-Terminus des Proteins. In das Expressionsplasmid E wurde die kodierende Sequenz des H-Proteins 1 (AtGLDH1) aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Die inserierte DNA-Sequenz in Plasmid F kodiert für ein mutiertes AtGLDH1-Protein. Analog zu FtGLDH^{AA} wurden der kodierenden Sequenz 6 Basenpaare eingefügt, welche zwei zusätzliche Alanin-Moleküle nach den ersten beiden Aminosäuren am N-Terminus des Proteins kodieren (AtGLDH1^{AA}). Das Plasmid G beinhaltet die kodierende Sequence des H-Proteins aus *Homo sapiens*. Das Gen der Lipoatligase-A aus *E. coli*, ein Enzym welches das H-Protein mit Lipoat modifiziert, wurde über die *NdeI* und *HindIII*-Schnittstellen in die MCS von Plasmid H kloniert. Alle inserierten Gene der Plasmide A-H sind mit einem N-terminalen Polyhistidin-Tag fusioniert, der eine Aufreinigung über IMAC ermöglicht. Die Expression aller Proteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Kultivierungsmedium induziert.

9.4.3. Expressionsplasmide mit Basis pET-28a

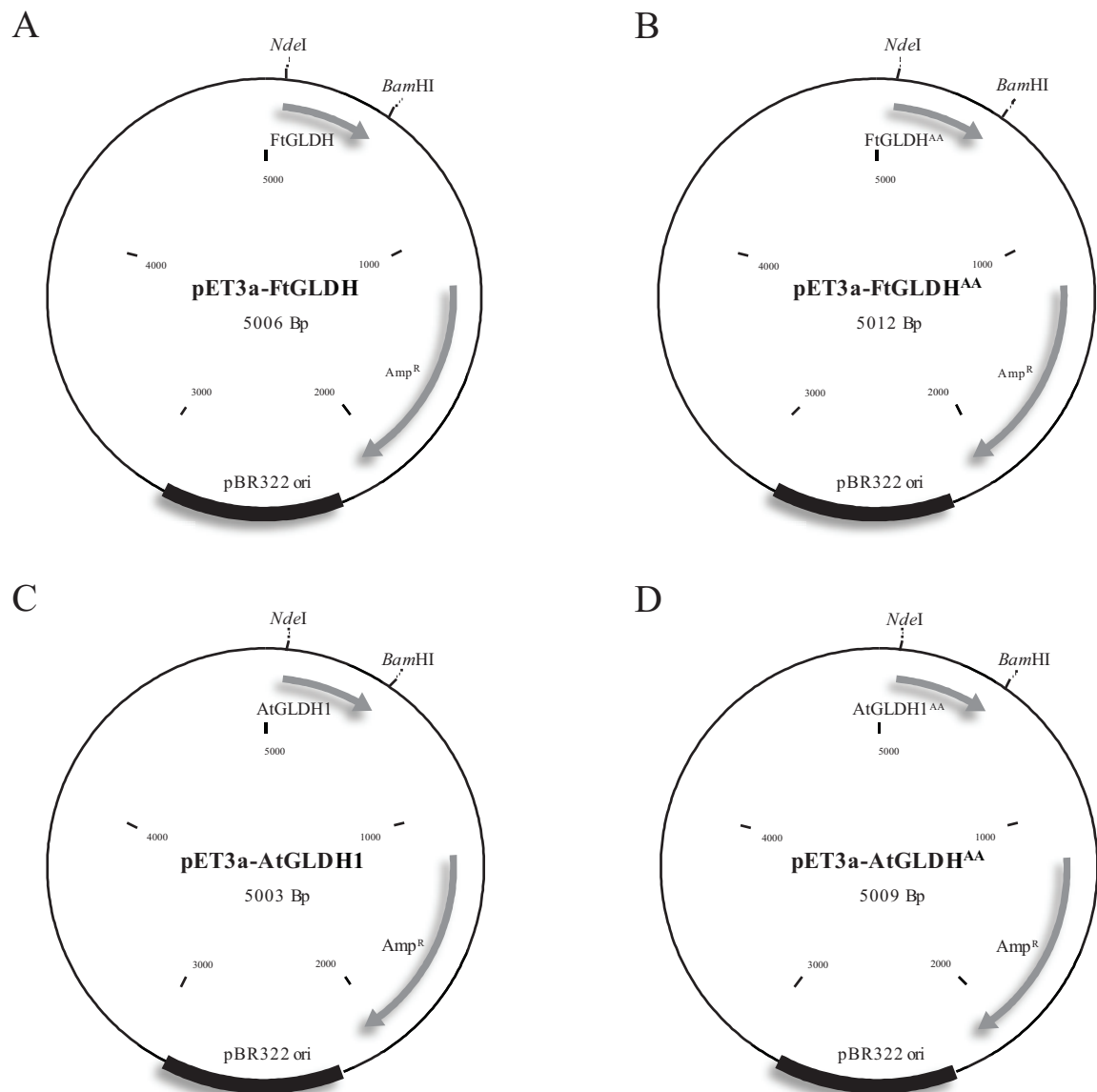


Abb. 66: Expressionsplasmide pET3a-FtGLDH, pET3a-FtGLDH^{AA}, pET3a-AtGLDH1 und pET-AtGLDH1^{AA}. Die Plasmide A-D beinhalten die ORFs der Plasmide C-F der Abbildung 13. Die Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* aus den entsprechenden Expressionsplasmiden geschnitten und über identische Restriktionsschnittstellen in pET3a kloniert. Die exprimierten Proteine sind ohne Affinitätstag ausgestattet. Die Expression aller Proteine wird durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Kultivierungsmedium induziert.

9.4.4. Expressionsplasmid mit Basis pCA24N

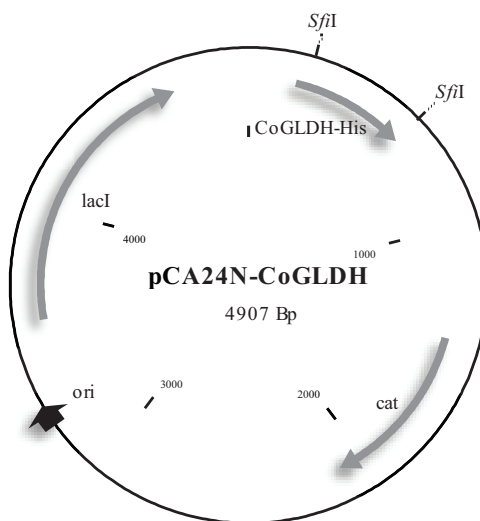


Abb. 67: Das Expressionsplasmid pCA24N-CoGLDH. Dieses Plasmid stammt aus dem Expressionsklon JW2872 der ASKA-Serie. Über die *SfuI*-Schnittstelle des Vektors wurde das H-Protein-Gen aus *E. coli* inseriert. Durch die Verwendung dieser Schnittstelle wird das Protein N-terminal mit einem Polyhistidintag fusioniert, welcher die Aufreinigung über IMAC ermöglicht. Die Expression des H-Proteins (CoGLDH) erfolgt durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Kultivierungsmedium.

9.5. Liste der am ESRF aufgenommenen Datensätze

Tabelle 39: Datensätze von verschiedenen P-Protein-Kristallen (ID-14-4, Grenoble, Frankreich). Von allen untersuchten Kristallen wurde ein *high-resolution*-Datensatz (HR) sowie ein *low-resolution*-Datensatz (LR) erzeugt. Start: Winkel zum Start der Messung des Datensatzes, *os. range*: Oszillationsgrad, *exp. time*: Dauer der Bestrahlung pro Bild, *images*: Anzahl der aufgenommenen Bilder

P-Protein	Kristallisationsbedingungen	HR-Datensatz	LR-Datensatz
P-Apoprotein 1	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 290°	Start: 290°
	0,2 M CsCl	<i>os. range</i> : 1°	<i>os. range</i> : 2°
	19 % w/v PEG 3350	<i>exp. time</i> : 1 s	<i>exp. time</i> : 0,3 s
		<i>images</i> : 180	<i>images</i> : 90
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å
P-Apoprotein 2	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 0°	Start: 0°
	0,2 M CsCl	<i>os. range</i> : 0,5°	<i>os. range</i> : 1,5°
	22 % w/v PEG 3350	<i>exp. time</i> : 0,5 s	<i>exp. time</i> : 0,3 s
		<i>images</i> : 360	<i>images</i> : 120
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å

P-Apoprotein 3	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 40°	Start: 40°
	0,3 M LiCl	<i>os. range:</i> 0,5°	<i>os. range:</i> 2°
	17 % w/v PEG 3350	<i>exp. time:</i> 0,5 s	<i>exp. time:</i> 0,3 s
		<i>images:</i> 360	<i>images:</i> 90
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å
P-Inhibitor 1	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 0°	Start: 0°
	0,2 M CsCl	<i>os. range:</i> 1°	<i>os. range:</i> 2°
	15 % w/v PEG 3350	<i>exp. time:</i> 1 s	<i>exp. time:</i> 0,5 s
		<i>images:</i> 180	<i>images:</i> 90
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å
P-PLP 1	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 350°	Start: 350°
	0,2 M CsCl	<i>os. range:</i> 0,5°	<i>os. range:</i> 2°
	19 % w/v PEG 3350	<i>exp. time:</i> 0,5 s	<i>exp. time:</i> 0,4 s
		<i>images:</i> 360	<i>images:</i> 90
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å
P-PLP 2	0,1 M Tris pH 7,75	Start: -30°	Start: -30°
	0,2 M CsCl	<i>os. range:</i> 1°	<i>os. range:</i> 2°
	19 % w/v PEG 3350	<i>exp. time:</i> 0,75 s	<i>exp. time:</i> 0,5 s
		<i>images:</i> 180	<i>images:</i> 90
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å
P-Inhibitor + PLP 1	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 0°	Start: 0°
	0,25 M CsCl	<i>os. range:</i> 1°	<i>os. range:</i> 2°
	19 % w/v PEG 3350	<i>exp. time:</i> 1 s	<i>exp. time:</i> 0,3 s
		<i>images:</i> 180	<i>images:</i> 90
		Auflösung: 2 Å	Auflösung: 3,5 Å
P-Inhibitor + PLP 2	0,1 M Tris pH 7,75	Start: 0°	nicht gemessen
	0,25 M CsCl	<i>os. range:</i> 1°	
	19 % w/v PEG 3350	<i>exp. time:</i> 0,75 s	
		<i>images:</i> 360	
		Auflösung: 2 Å	

9.6. Erklärung zur Selbstständigkeit

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen, als solche kenntlich gemacht habe.

Dirk Hasse

Rostock, den 5.05.2010

9.7. Danksagung

Als Erstes geht mein Dank an Prof. Dr. Hermann Bauwe für Möglichkeit der Bearbeitung und Durchführung dieses sehr interessanten Themas in seiner Arbeitsgruppe. Des Weiteren bedanke ich mich für das rege Interesse an meiner Arbeit und auch für das in schwierigen Situationen entgegengebrachte Vertrauen. Die finanzielle Unterstützung während der Promotionszeit hat hielt mir ebenfalls den Rücken frei.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Hagemann für all die Unterstützung über die vielen Jahre. Seine Begeisterung für Wissenschaft war ansteckend und motivierend. Die vielen Gespräche halfen enorm, um sich auf die wichtigen Inhalte zu konzentrieren. Ohne die Unterstützung wären viele der erzielten Ergebnisse nicht möglich gewesen.

Ebenfalls an dickes Dankeschön geht nach Uppsala an Frau Prof. Dr. Inger Andersson für die Unterstützung während der Proteinkristallisationen. Es hat mich sehr beeindruckt, wie sie mich als „Fremden“ sofort herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufnahm und mich sowohl fachlich als auch finanziell unterstützte. Ein weiterer großer Dank gilt Dr. Evalena Andersson für die Auswertung der Beugungsdaten sowie Dr. Karin Valegård und Glareh Askarieh für die Hilfe während der Proteinkristallisationen.

Bei den ehemaligen und heutigen Mitgliedern der AG Hagemann, besonders Marion, Kathrin, Stephan, Oliver und Claudia, sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Pflanzenphysiologie möchte ich mich für die wunderbare Begleitung auf dem Weg zur Promotion bedanken. Die Atmosphäre im Labor war immer sehr angenehm und die fachlichen Diskussionen hilfreich.

Klaudia und Manja danke ich für ein funktionierendes Rostocker Labor!

Meinen Freunden möchte ich ebenfalls danken. Ganz besonders danke ich Stefan und Susi für die positive Ablenkung von der Wissenschaft an den Wochenenden. Ohne Euch hätte ich wohl nur noch im Labor gestanden.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine Eltern, Familie und vor allem Katja. Ihr wart mir während der letzten Jahre, insbesondere in schlechten Zeiten, immer eine besondere Stütze. Euer seelischer und finanzieller Rückhalt hat mir immer sehr geholfen.

9.8. Publikationsliste

- Ribbeck-Busch, K., Roder, A., **Hasse, D.**, de Boer, W., Martinez, J. L., Hagemann, M. & Berg, G. (2005). A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*, *Environ Microbiol* 7, 1853-1858.
- Hagemann, M., **Hasse, D.** & Berg, G. (2006). Detection of a phage genome carrying a zonula occludens like toxin gene (zot) in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*, *Arch Microbiol* 185, 449-458.
- Eisenhut, M., Kahlon, S., **Hasse, D.**, Ewald, R., Lieman-Hurwitz, J., Ogawa, T., Ruth, W., Bauwe, H., Kaplan, A. & Hagemann, M. (2006). The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria, *Plant Physiol* 142, 333-342.
- Hasse, D.**, Mikkat, S., Thrun, H. A., Hagemann, M. & Bauwe, H. (2007). Properties of recombinant glycine decarboxylase P- and H-protein subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *FEBS Lett* 581, 1297-1301.
- Hagemann, M., Ribbeck-Busch, K., Klähn, S., **Hasse, D.**, Steinbruch, R. & Berg, G. (2008). The plant-associated bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* expresses a new enzyme for the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol, *J Bacteriol* 190, 5898-5906.
- Hasse, D.**, Mikkat, S., Hagemann, M. & Bauwe, H. (2009). Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase, *Febs J* 276, 6985-6991.
- Hasse, D.**, Hagemann, M., Andersson, I. & Bauwe, H. (2010). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analyses of the homodimeric glycine decarboxylase (P-protein) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, Vol. 66, *Acta Crystallographica Section F*, pp. 187-191.

9.9. Lebenslauf

Schulausbildung

1997	Abitur; Prädikat 2,3 Leistungskurse: Biologie, Mathematik
1990 - 97	Gymnasium Malchin
1985 - 90	F.-J. Currie - Schule

Studium

2005-2010	Promotionsstudium an der Universität Rostock am FB Biowissenschaften, Abt. Pflanzenphysiologie, Thema: „Biochemische und strukturelle Charakterisierung des P-Proteins aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803“
1998-04	Biologiestudium an der Universität Rostock, Abschluss: Diplom Thema der Doktorarbeit: „ <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405: Entwicklung einer Methode und Charakterisierung von erzeugten Mutanten“

Wissenschaftliche Zusammenarbeit

Juni-Oktober 2009	Forschungsaufenthalt an der <i>University of Agricultural Sciences</i> in Uppsala (Schweden) zur Durchführung von Proteinkristallisationsexperimenten
April-Dezember 2008	Forschungsaufenthalt an der <i>University of Agricultural Sciences</i> in Uppsala (Schweden) zur Durchführung von Proteinkristallisationsexperimenten
Juni-2007	Forschungsaufenthalt an der <i>University of Agricultural Sciences</i> in Uppsala (Schweden) zur Durchführung von Proteinkristallisationsexperimenten
Februar 2005	Forschungsaufenthalt an der Justus-Liebig-Universität zur Durchführung von Proteininteraktionsexperimenten

Stipendien

2008	Förderung des Auslandsaufenthalts durch ein „Kurzstipendium für Promotionsstudenten“ des DAAD
------	---

2005-2007 Förderung durch das Landesgraduiertenprogramm des
Landes Mecklenburg Vorpommern

Poster

Annual Conference of the VAAM, Osnabrück, Germany, 2007

Dirk Hasse, Stefan Mikkat, Martin Hagemann and Hermann Bauwe: Glycine Decarboxylase from *Synechocystis* sp. PCC 6803: a useful tool to characterize plant H-proteins.

Co-Autor

3rd International Symposium "Signals, Sensing And Plant Primary Metabolism" of the Collaborative Research Center SFB 429, Potsdam, Germany, 2006

Marion Eisenhut, **Dirk Hasse** and Martin Hagemann: Do cyanobacteria perform a plant-like phosphoglycolate (photorespiratory) cycle? Possible pathway and function.

Rostock, 05.05.2010

Dirk Hasse

